Перспективы и принципы использования клеточных культур в заместительной терапии

Н.П. Глинских
доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций МЗ РФ

Культуры клеток и тканей – область биологии, имеющая начало более века назад, но получившая свое настоящее развитие в последние 30-40 лет, когда появились методики, обусловившие возможность культивирования отдельных клеток. Сегодня значительное количество клеток, из 200 составляющих человеческий организм, успешно размножаются in vitro. В их число входят прежде всего фибробласты, миобласты, эндотелиальные, а также некоторые эпителиальные клетки – кератиноциты, уротелиальные и эпителия молочной железы. Следствием развития и совершенствования клеточной биологии явилось формирование нового направления клеточной и тканевой инженерии, относящегося к биомедицинской технологии, основанной на использовании культивированных клеток человека. Задача этого направления – обеспечение замещения, восстановления поврежденных тканей за счет имплантации или трансплантации выращенных in vitro клеток из здоровых тканей и органов. Возможность культивирования в достаточном объеме необходимых для практики клеток делает реальным их использование в клинике. В России это направление получило развитие в ряде научных и практических учреждений: Институт цитологии РАН, Военно-медицинская академия МО РФ, Институт хирургии им. А.В. Вишневского РАМН, Институт кардиологии МЗ РФ и др.

Фундаментальные исследования по биологии клетки в культуре проводятся в Институте цитологии РАН. Они имеют прямой выход в клиническую практику по различным направлениям клеточной терапии. Разработки выполнены на культивируемых кератиноцитах кожи человека и новорожденных крысят; кардиомицитах из желудочков сердца крыс, а также на кера-

тиноцитах человека и ряде других клеточных линий. В ходе выполнения исследований на культивируемых клетках кожи человека было освоено выращивание in vitro многослойных пластов кератиноцитов (аналог эпидермиса кожи) с целью их трансплантации на ожоговые раны. Отработаны также условия приготовления дермального эквивалента с использованием эмбриональных фибробластов и коллагена 1 типа.

Клиникой сердечно-сосудистой хирургии Военно-медицинской академии МО РФ и Институтом кардиологии были отработаны модели ишемии in vitro и in vivo, на которых проверялось влияние культивируемых кардиомиоцитов на состояние ишемических клеток. Полученные результаты дали основание сделать вывод о положительном влиянии имплантированных кардиомицитов на поврежденный миокард и восстановление его функциональной активности.

В нейрохирургии, также как и в сосудистой хирургии, существует проблема оптимизации используемых в практике протезов костной ткани. Исследования, проводимые как с использованием диплоидных остеогенных клеток (из черепа новорожденных крысят), так и клеток постоянной линии ROS 17/2-8, показали, что оптимизация протезов костной ткани с помощью элементов внеклеточного матрикса достаточно перспективны. Культивируемые клетки как самостоятельные агенты, так и в комплексе с элементами клеточного матрикса приводят к ускорению и качественно лучшему заживлению ран.

В настоящее время сформировались два основных направления в области использования культивируемых клеток для лечения тяжело обожженных. Первое направление заключается в использовании для закрытия ожоговых поверхностей пластов культивируемых кератиноцитов (клеток покровного эпителия), полученных чаще всего из аутоклеток, значительно реже – из аллокератиноцитов. Второе направление предусматривает использование для закрытия раневых поверхностей так называемых “эквивалентов кожи”, которые включают в себя не только культивируемые кератиноциты, но и дермальный эквивалент, состоящий из коллагена, гликозамингликанов и др. Уже

на первых этапах клинического применения трансплантатов из культивируемых кератиноцитов определился ряд недостатков, препятствующих их широкому клиническому использованию. В частности, использование кератиноцитов не дает возможности создать банк клеток, а сроки, необходимые для изготовления клеточного пласта, велики и составляют 3-4 недели. Длительные сроки получения трансплантатов увеличивают риск развития инфекционных осложнений ожоговой болезни и удлинняют время пребывания пациентов в стационаре. Высока стоимость специальных питательных сред и биологически активных стимуляторов роста кератиноцитов. Следует подчеркнуть, что результаты использования культивируемых клеток в значительной степени зависят от подготовки к трансплантации самой ожоговой раны. В случаях трансплантации культивируемых кератиноцитов на раневую поверхность приживается в среднем 55% от используемых пересаженных клеток, а при гранулирующих ранах этот процент снижается до 15%.

Культивированные кератиноциты из полости рта использовались для регенерации ротового эпителия, а культивированные кератиноциты из уретры для коррекции врожденных дефектов пениса. В Великобритании культивируемые эпидермальные кератиноциты были использованы для создания эпителиальной выстилки полости ячеек сосцевидного отростка, хронически инфицированных в связи с заболеванием среднего уха. Культивированные трансплантаты используются также для лечения хронических кожных язв. А. Лей с коллегами приступили к изучению возможностей этого метода применительно к язвам на конечностях, которыми страдают люди пожилого возраста в результате нарушений кровообращения или в связи с диабетом.

Установлено, что кератиноциты способны синтезировать множество полипептидных факторов роста. Один из них, обозначаемый как ТГФ (трансформирующий фактор роста), представляет собой полипептид, который, подобно фактору роста эпидермиса, способствует пролиферации и миграции кератиноцитов. ТГФ можно рассматривать как аутокринный фактор

роста, который стимулирует рост тех же клеток, которые его секретируют. Принимая во внимание многочисленность полипептидов, которые секретируются кератиноцитами, можно предположить, что среди них есть и другие факторы, обладающие аутокринным действием. Роль культивируемых аллотрансплантатов в заживлении хронических язв, видимо, заключается в следующем. В глубине язвенной ниши могут оставаться группы кератиноцитов, относящиеся к волосяным фолликулам или потовым железам. Поскольку условия на поверхности язвы неблагоприятны для миграции и пролиферации кератиноцитов, они не покрывают рану, но и не погибают. При достаточной стимуляции аутокринными факторами роста эндогенные кератиноциты начинают размножаться и мигрировать. К такому ответу способны и более многочисленные кератиноциты, окаймляющие рану, которые будут сокращать ее периметр.

Использование культивированных фибробластов для закрытия раневых поверхностей сразу же показало ряд существенных преимуществ этого метода по сравнению с применением кератиноцитов: получение фибробластов в культуре не требует дорогостоящих питательных сред, стимуляторов роста, что более чем в 20 раз снижает стоимость клеток; фибробласты легко поддаются пассированию, при котором они частично утрачивают поверхностные антигены гистосовместимости; применение культуры фибробластов открывает возможность использования для изготовления трансплантатов аллоклеток и создания клеточных банков; сокращаются сроки получения трансплантатов, готовых к использованию в клинике с 3-4 недель до 2-3 суток; приживление трансплантата из фибробластов составляет до 97%. В течение 15 лет после начала экспериментальной разработки этого метода в Институте хирургии им. А.В. Вишневского РАМН обеспечено его внедрение в клиническую практику. Этот метод принципиально отличается от всех известных в мировой практике тем, что в качестве культивируемого пласта клеток впервые использованы не кератиноциты, а фибробласты. В предшествующих фундаментальных исследованиях с применением электронно-авторадиографичес-

ких методов изучения гранулирующей ткани авторами было установлено, что перициты, окружающие мелкие сосуды, являются полипотентными мезенхимальными клетками, трансформирующимися в фибробласты. Последние обладают сильным стимулирующим действием на адгезию и пролиферацию кератиноцитов.

Фибробласты активно синтезируют ДНК, что документировано интенсивным включением тимидина. Одновременно фибробласты трансплантата активно пролиферируют, что кардинально отличает их от фибробластов эквивалентов дермы, разработанных в Массачусетстком технологическом институте, содержащих неактивные клетки. Выращенные in vitro фибробласты главным образом применяются при лечении ожогов IIIб-IV степени.

Повышение способности к росту в культуре для любых клеток – дело далеко не простое, здесь нет никаких общих рецептов. Приходится глубоко изучать биологию каждого типа клеток и учиться на практике применять эти знания, а порой необходимо и нечто большее – проницательность, интуиция, иной раз просто удача. Клеточная культура – популяция разобщенных, не образующих ткань клеток, существующих in vitro.

Диплоидная клеточная линия – клеточная культура, в которой не менее 75% клеток имеют диплоидный кариотип, полностью соответствующий нормальному кариотипу клеток животного, послужившего их источником.

Учитывая особенности диплоидных клеточных штаммов, представляется перспективным использование их для создания фонда, способного обеспечить потребности в заместительной терапии. При работе с диплоидными клеточными культурами используют питательные среды постоянного состава, так как при его изменении возможны морфологические и карнологические изменения в клетках, что может привести к изменению свойств культуры. Наиболее широко используются среды Игла и 199 или их смеси в различных соотношениях. Несколько реже - среды RPMI-1640, Дульбекко и некоторые другие. Сре-

ды наиболее пригодные для культивирования конкретных клеточных линий и штаммов указаны в их паспортах.

Сыворотка крови животных, как правило, эмбриональная крупного рогатого скота, является пока необходимым элементом питательных сред и добавляется в среду в количестве 10 % от объема, в зависимости от культуры клеток и условий культивирования. Следует использовать только сыворотку крови без консервантов. Сыворотка крови может быть одним из наиболее вероятных источников попадания микоплазм и некоторых видов бактерий в клеточные культуры. Поэтому для снижения вероятности этого перед использованием сыворотку следует прогревать при 45°С в течение 1 часа. Предпочтительно использование сертифицированной сыворотки, свободной от контаминантов. Добавление антибиотиков в среду роста клеточных культур исключено.

Для отделения монослоя клеток от стекла может быть использован стерильный 0,02% раствор Версена на буферном растворе Эрла или Хенкса и растворы протеолитических ферментов (трипсина, химопсина, коллагеназы) или их смесей в различных соотношениях. При работе на пластиковой посуде возможно использование только протеолитических ферментов. Снятие монослойных культур с субстрата производится в среднем на 4-5 день, сразу после образования плотного монослоя. Матрасы с клетками просматривают в проходящем свете, обращая внимание на цвет питательной среды — при росте клеток происходит сдвиг pH в кислую сторону, что приводит к некоторому пожелтению среды.

Паспортизированные и сертифицированные диплоидные клеточные культуры человеческого происхождения предпочтительнее всего использовать для заместительной терапии при лечении ожоговых ран. Применение диплоидных культур открывает возможность использования для изготовления трансплантатов аллоклеток и создания клеточных банков, обеспечивая сроки получения трансплантатов, готовых к применению в клинике в течение 3-4 суток.

Наряду с использованием клеточных культур для лечения

ожоговых больных представляется возможным создание комплексного подхода к внедрению принципов заместительной терапии больных с травмами опорно-двигательного аппарата, при восстановлении и коррекции функций поврежденных тканей и органов.

В 1998 году в ЕНИИВИ было начато экспериментальное использование авторской диплоидной культуры аллофибробластов при лечении глубоких термических поражений на базе детского ожогового отделения ДГКБ № 9 г.Екатеринбурга. В своей работе мы исходили из необходимости применения аллофибробластов, имеющих полную паспортную характеристику, и возможности обеспечения ими полного курса лечения больных. В связи с этим был сделан выбор в пользу диплоидного штамма фибробластов ЛЭЧ – 4 (81), охарактеризованного, согласно требований ВСКК, зарегистрированного в качестве оригинального и сохраняемого в низкотемпературном банке – музее ЕНИИВИ. Применение культуры для предоперационной трансплантации на рану с целью ускорения её эпителизации у больных с глубокими ожогами оказалась оправданным.

4-5-суточная монослойная культура клеток ЛЭЧ – 4 (81) используется для получения взвеси клеток, которую наносят на специально подготовленную чистую рану из расчета 30 –50 тыс. клеток на 1 $см^2$.

Положительные результаты использования авторского диплоидного штамма клеток явились предпосылкой создания на его основе препарата аллофибробластов, потребность в котором может быть удовлетворена за счет создания криобанка. Выполнение заявок практического здравоохранения возможно в течение 3-5 дней с момента поступления запроса на аллофибробласты. В дальнейшем перспективно использование их не только в комбустиологии, но и в стоматологии и косметологии. Безусловно, необходимым является создание новых штаммов диплоидных клеток, пригодных для заместительной терапии по различным направлениям. Одним из источников выделения новых культур, возможно, надо считать амниотическую оболочку клетки пуповины и костного мозга. Данные литера-

туры и результатов наших исследований показывают высокую эффективность и экономическую целесообразность внедрения новых технологий заместительной терапии.

Литература:

1. Адамс Р.Г. // Методы культур клеток для биохимиков. – М- Мир –1983.
2. Блинова М.И., Пинаев Г.П. // Клеточная заместительная терапия . Инновация. СПб., 2000г. 1-2, - с.94-96.
3. Глинских Н.П., и др. Паспорт – каталог стабильных клеточных линий и штаммов низкотемпературного банка-музея // Свердловск – 1979.
4. Глинских Н.П. и др. Методические рекомендации по стандартизации работы с клеточными культурами для вирусологических исследований. Свердловск 1990.
5. Леннет Э., Шмидт Н. Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний. М- Медицина- 1974.
6. Методические указания по получению, аттестации и контролю линий диплоидных клеток, используемых в качестве субстрата для производства медицинских иммунобиологических препаратов. – Минздрав СССР,- Москва – 1986.
7. Туманов В.П., Глущенко Е.В., Морозов С.С., Саркисов Д.С. // Бюлл. экспер. биол. и мед., 1990, №4, с400-402.
8. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Туманов В.П.// Методические рекомендации "Метод хирургического лечения ожогов у детей с использование культивированных аллофибробластов человека" Москва 1997.
9. Фолдс Б., Найп Д. // Вирусология. – М. – Мир.- 1989 – т.2-3.
10. Green H. Cell. –1985.- vol. 16. – P 801- 811.