

Теребай А.А., Сазыкулова Г.Дж., Мараховская Л.Г., Наханов А.К.

**VERO КЛЕТКАЛАРЫНЫН КУЛЬТУРАСЫН АР КАНДАЙ
МИКРОАЛЫПЖУРУУЧУЛӨРГӨ КӨЧҮРҮҮ**

Теребай А.А., Сазыкулова Г.Дж., Мараховская Л.Г., Наханов А.К.

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК VERO
НА РАЗЛИЧНЫЕ МИКРОНОСИТЕЛИ**

A. Terebay, G. Sazykulova, L. Marakhovskaya, A. Nakhanov

**CULTIVATION OF VERO CELL CULTURE ON VARIOUS
MICRO-CARRIERS**

УДК: 575.831.2:57.083.224

Макалада Vero клеткаларын көчүрүү үчүн оптималдуу микроалып жүрүүчүлөрдү тандоо натыйжалары берилген. Vero клеткаларынын микроалып жүрүүчүлөргө көчүрүүнүн ар кандай параметрлерин салыштырмалуу изилдөөлөрүнөн алынган жыйынтыктардын негизинде ар бир микроалып жүрүүчүнүн өзүнө мүнөздүү артыкчылыгы жана жетишсиздиги бар экендиги аныкталды. Биздин изилдөөлөрдө төмөнкү микроалып жүрүүчүлөр салыштырылды: Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III, Cytodex-1 и Cytodex-3. Клеткалардын биригүү жана көбөйүү, микроалып жүрүүчүлөрдүн клеткаларга толуу, клеткалык монокатмардын пайда болуу динамикасы аныкталды. Мындан тышкары, микроалып жүрүүчүлөрдү кайталап пайдалануу мүмкүнчүлүгү изилдени. Изилдөөлөрдүн жыйынтыгында жогорку адгезивдүү деп Cytodex-3 жана Cytodex-1 микроалып жүрүүчүлөр табылды.

Негизги сөздөр: микроалып жүрүүчүлөр, монокатмар, Vero, Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III, Cytodex-1, Cytodex-3.

В данной статье представлены результаты подбора оптимальных микроносителей для культивирования клеток Vero. На основании результатов сравнительного исследования различных параметров культивирования клеток Vero на микроносителях, установлено что у каждого микроносителя есть свои характерные преимущества и недостатки. В нашем исследовании сравнивались микроносители: Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III, Cytodex-1 и Cytodex-3. Определяли динамику прикрепления и размножение клеток, полноту заполнения микроносителей клетками, сроки формирования клеточного монослоя. Кроме того, изучали возможность повторного использования микроносителей. В результате исследований установлено, что наибольшей адгезивностью обладают микроносители Cytodex-3 и Cytodex-1.

Ключевые слова: микроносители, монослой, Vero, Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III, Cytodex-1, Cytodex-3.

This article presents the results of the selection of optimal microcarriers for the cultivation of Vero cells. Based on the results of a comparative study of various parameters of cultivation of Vero cells on micro-carriers, it was found that each micro-carrier has its own characteristic advantages and disadvantages. In our study, microcarriers were compared: Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III, Cytodex-1 and Cytodex-3. The dynamics of attachment and reproduction of cells, the completeness of filling of microcarriers with cells, the timing of the formation of a cellular monolayer were determined. In addition, the possibility of reuse of micro-carriers was studied. As a result of the research, it was found that Cytodex-3 and Cytodex-1 microcarriers have the greatest adhesion.

Key words: microcarriers, monolayer, vero, helix, plastic, plastic plus, collagen, fact III, cytodex-1, cytodex-3.

Введение. Массовое культивирования клеток является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь, производства вирусных препаратов. Эта стадия определяет массу и качество клеток и, тем самым, в целом технологию получения вирусного сырья. Выбор способа культивирования вируса в значительной мере определяется способностью клеток размножаться на поверхности плотного субстрата или в суспензионной культуре.

Трудно определить верхние и нижние границы крупномасштабного или промышленного выращивания вирусов в клеточных культурах. Все зависит от масштабов производства вирусных препаратов. Широко распространение клеточных культур и постоянно возникающие новые аспекты их применения обусловлены появлением все большего числа клеточных линий [1-6]. Однако нельзя не принимать во внимание и тот факт, что успехи в культивировании клеток и применение клеточных культур в различных областях биологии возможны лишь при наличии современной первоклассной техники [7,8]. Необходимость индустриализации процесса изготовления вакцин, получения биологически активных веществ клеточной природы привела к созданию ряда высокопроизводительных способов культивирования клеток млекопитающих. Одним из наиболее эффективных является псевдосуспензионный способ культивирования клеток на микроносителях предложенный в 1967 г. Ван Везелом (Van Wesel) [9]. К микроносителям обычно относят микрогранулы диаметром 90-350 мкм и плотностью немного больше, чем вода, способная поддерживать прикрепление и рост клеток [10]. Типичная клеточная культура на основе микроносителя включает три основных этапа прикрепления клеток, пролиферации и открепления. Прикрепление клеток на микроносителях, как начальный этап, оказывает серьезное влияние на эффективность всего процесса [11, 12]. Клеточная линия Vero имеет ряд преимуществ по сравнению с первичными и диплоидными клеточными субстратами [13]. Клетки Vero можно использовать для культивирования на микроносителях и суспензионным методом для крупномасштабного производства в биореакторах. Кроме того, достигаемый титр вируса вы-

ше, чем при использовании других типов клеточных субстратов [14,15]. Эти свойства значительно облегчают производство вакцин в развивающихся странах, что является важной целью Всемирной организации здравоохранения. Кроме того, клетки Vero были тщательно охарактеризованы для оценки их онкогенного потенциала. Несколько исследований показали, что клеточная линия Vero не обладает онкогенными свойствами и не представляет никакой угрозы для здоровья человека при использовании в качестве субстрата для биологической продукции [16,17]. Таким образом культура клеток Vero была принята для производства вирусных вакцин [18] и в настоящее время используется в производстве гриппа [19,20], полиомиелита [21,22], бешенство [23]. На сегодняшний день культивирование на микроносители открывает новые возможности и впервые позволяет получить на практике высокопродуктивную культуру зависимых от закрепления клеток. Кроме того, микроносители позволяют увеличивать масштаб за счет переноса клеток от шарика к шарика путем добавления свежих микроносителей. Другим преимуществом использования метода культивирования клеток на микроносителях является снижение затрат на производство клеток. Поскольку достигается большая плотность клеток, технология микроносителей приводит к сокращению лабораторных и складских помещений, необходимой для обычного производства. Кроме того, клеточные культуры могут быть адаптированы к производственным процессам, включающим биореакторы, которые являются масштабируемыми, требуют меньше места и где можно использовать аналитические технологии для мониторинга производства, а также для контроля и поддержания процесса в рамках заданных параметров. Более того, это позволяет ускорить производство, особенно во время пандемий, когда нужны вакцины.

Материалы и методы исследования. Метод обработки микроносителей. В качестве микроносителей применяли Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III фирмы Sartorius, Cytodex-1 и Cytodex-3 фирмы Cytiva. Микроносители 3-хкратно ополаскивали деионизированной водой, сливали воду и заливали фос-

фатным буферным раствором затем автоклавировали при температуре 121 °С (1,0 атм) в течение 30 минут.

Подбор питательных сред. Для подбора оптимальной питательной среды использовали питательные среды DMEM, EMEM и ПСП (НИИПББ), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки.

Культивирование клеток на микроносителях. В работе использовали перевиваемую культуру клеток Vero (CCL-81, ATCC) из коллекции культур клеток НИИПББ МЗ РК. Для псевдосуспензионного культивирования культуры клеток Vero использовали флаконы объемом 175 мл в спиннерах Techne. Скорость вращения спиннера составляло 40-60 об/мин. Посевная концентрация клеток была в пределах $3,0 \times 10^5$ клеток в 1 мл. Микроносители вносили в количестве 1 г на литр среды. Ежедневно отбирали пробы в количестве 1 мл и с помощью микроскопа определяли полноту заполнения микроносителей клетками и изучали морфологию клеток. Выход клеточного материала определяли через сутки. Для снятия клеток использовали два ферментативных препарата: смесь 0,25 % раствора трипсина и 0,02% ЭДТА и раствор в разведении 1:3 TrypLE Select 10X (ThermoFisher). Клетки осаждали в течение 20 минут, ростовую среду удаляли, осадок микроносителей с клетками ополаскивали два раза ФСБ к осадку добавляли ферменты и выдерживали при температуре +37 °С до открепления клеток. Для полного снятия клеток с микроносителей проводили пепитирование, контролируя отделение клеток под микроскопом. После осаждения микроносителей отбирали пробы для подсчета клеток и жизнеспособность с помощью автоматического счетчика.

Изучение повторного использования. Микроносители обрабатывали выбранным ферментом и после полного открепления клеток, микроносители 3-хкратно ополаскивали питательной средой для удаления трипсина и ЭДТА и вносили клетки с концентрацией $3,0 \times 10^5$ клеток в 1 мл и культивировали до образование клеточного монослоя.

Результаты исследований и их обсуждение. Характеристики использованных микроносителей приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика микроносителей

Микроноситель	Производитель	Матрица	Покрытие поверхности	Диапазон размеров
Cytodex-1	Cytiva	Сшитый декстран	ДЭАЭ (третичный амин)	180-220 мкм
Cytodex-3	Cytiva	Сшитый декстран	Денатурированный коллаген свиной	180-220 мкм
Plastic	Sartorius	Полистирол	Сшитый полистирол	125–212 мкм
Plastic plus	Sartorius	Полистирол	Сшитый полистирол	125–212 мкм
Hellix	Sartorius	Декстран	Модифицированный полистирол	160 – 200 мкм
Collagen	Sartorius	Полистирол	Свиной коллаген I типа	125–212 мкм
Fact III	Sartorius	Полистирол	Поверхностно-модифицированный свиной коллаген типа I	125–212 мкм

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ КЫРГЫЗСТАНА, № 2, 2023

Данные по культивированию на различных питательных средах приведены на рисунке 1. При этом показано, что по ростовым показателям оптимальной средой является питательная среда DMEM. К поверхности микроносителей Cytodex 1 и Cytodex 3 клетки начали прикрепляться и распластывались через 10-12 ч и через 24-30 ч клетки занимали 90-95% поверхности микроносителей.

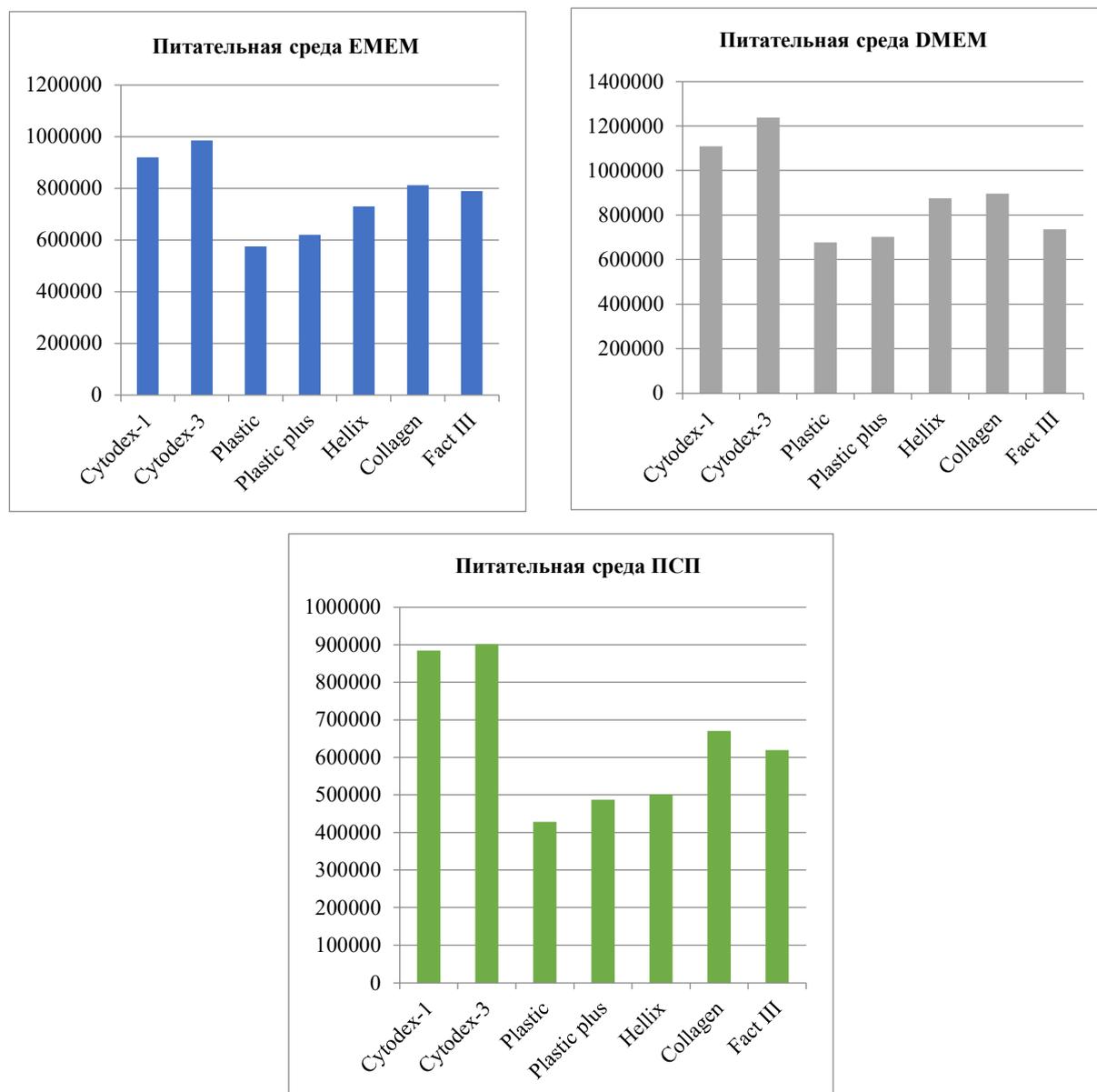


Рис. 1. Культивирования микроносителей на различных питательных средах.

Кроме того, было отмечено что микроносители Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III обладают очень низкой светопрозрачностью, которое негативно сказывалось при визуализации и оценке заполнения клетками микроносителей. Данные по прикреплению клеток к микроносителям показано на рисунке 2. После формирования клеточного монослоя, микроносители обрабатывали ферментом.

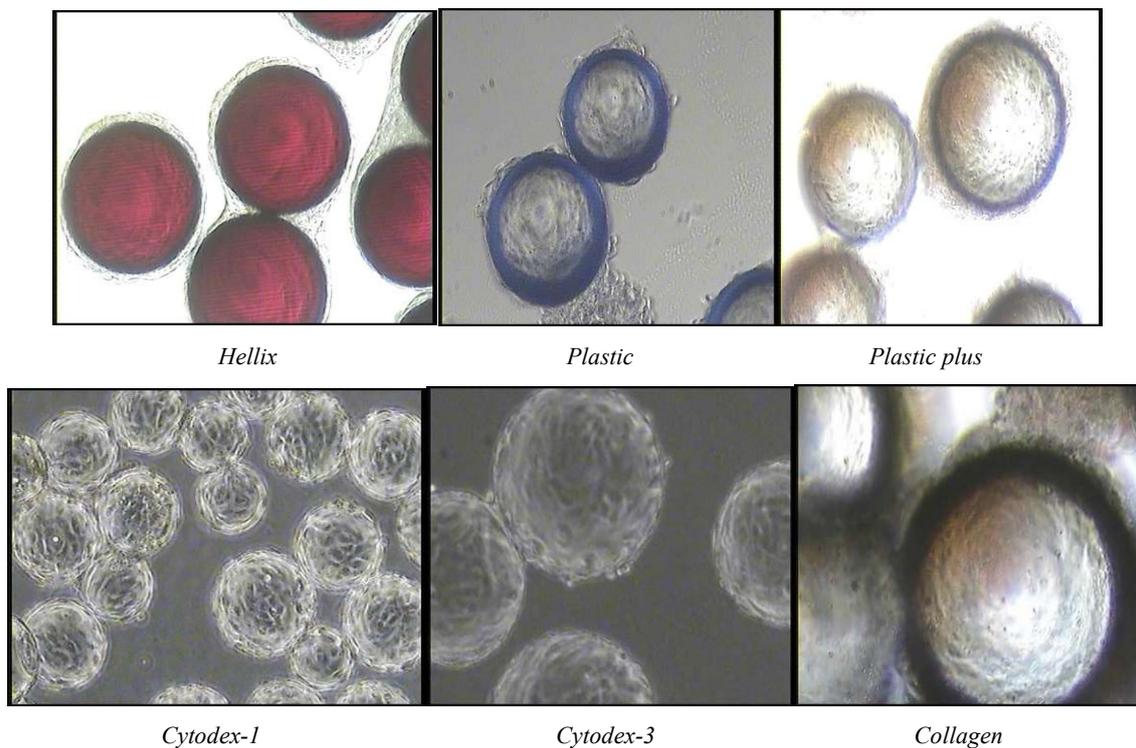


Рис. 2. Оценка микроносителей.

При использовании трипсина, время снятия клеток удлинялась на более чем 20 мин, и приводила к повреждению клеток и критическому снижению жизнеспособности до 5-10%. Тогда как использование препарата заменителя трипсина Tryple приводила к полному снятию клеток в короткое время (2-5 мин) и с достаточной жизнеспособностью клеток составляющей 90-94%. Исходя из вышеизложенного по росто-вым показателям и жизнеспособности клеток микроносители Cytodex-1 и Cytodex-3 выбраны наиболее оптимальными для культивирования клеток Vero.

Для изучения повторного использования микро-

носителей Cytodex-1, Cytodex-3 обрабатывали их раствором Tryple. Проведенные исследования показали, что обработка микроносителей Tryple не влияет на адгезивность Cytodex-1 и они пригодны для повторного культивирования клеток. При использовании микроносителей Cytodex-3, которые покрыты коллагеном было установлено растворение коллагена ферментом и образования сгустка коллагена с клетками. Диспергировать этот сгусток не удалось даже концентрированными растворами Tryple. Результаты прикрепления и роста клеток на микроносителях представлены на рисунке 3.

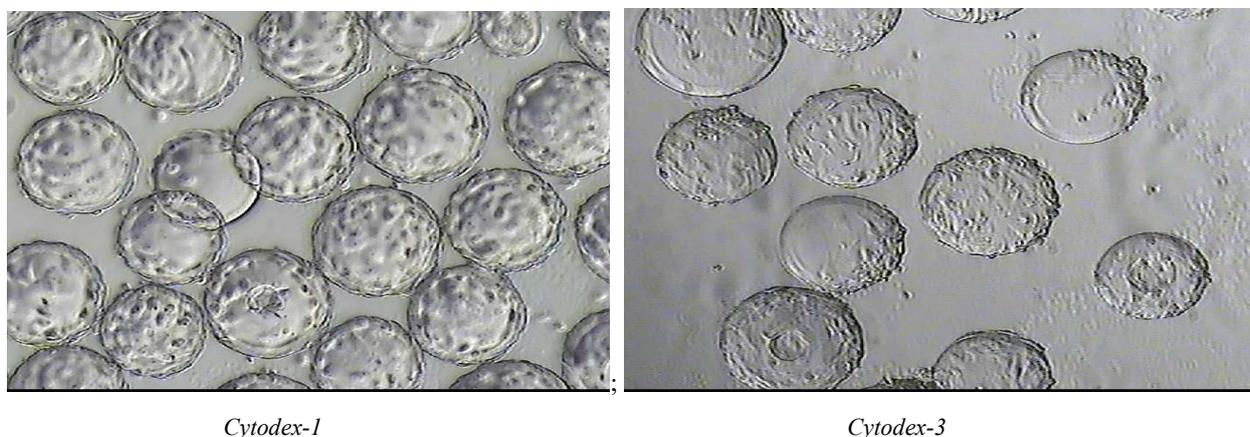


Рис. 3. Повторное использование микроносители.

В последние годы было проведено множество исследований и работ по улучшению прикрепления клеток в процессах клеточного роста на основе микроносителей из-за увеличения количества типов микроносителей. Поверхность микроносителей является его основным свойством, потому что именно здесь происходит взаимодействие между клетками и микроносителями. Микроносители содержат полимерную основу из различных материалов, таких как декстран, полистирол, стекло, целлюлоза, желатин, коллаген, альгинат и т.д. Кроме того, благодаря развитию тканевой инженерии широко используются биоразлагаемые полимеры, такие как полилактид (PLA) и поли(ε-капролактон) [24]. Что касается выделения клеток, то в литературе принято использовать протеолитические ферменты. Но из-за вредного воздействия этого метода на клетки были введены альтернативные методы [25]. Применение механических сил, введение термочувствительных или разделяющихся материалов на поверхность микроносителей и разработка разлагаемых микроносителей являются одними из альтернативных стратегий, предложенных исследователями.

Клетки, полученные из тканей животных, используются для покрытия микроносителей для индукции прикрепления и роста клеток. Этот метод использовался для разработки различных коммерческих микроносителей включая Cytodex-3, Collagen, Fact III, покрытых коллагеном. Тавассоли и др. говорили о рациональном использовании этого метода [26]. Несмотря на успешные исследования прикрепления и пролиферации клеток у микроносителей, обработанных коллагеном, было обнаружено, что коммерческие микроносители Cytodex-3 не могут выращивать эмбриональные клетки человека (hESC) в плюрипотентном состоянии в долгосрочной перспективе. Кроме того, когда стало производиться больше микроносителей, в состав которых входит животная ткань, они стали экономически дорогими. Впоследствии вместо тканей животных стали использовать студенистую белковую смесь из опухолевых клеток, рекомбинантные белки, катионные полимеры, полилизин, ламинин и др. вещества [27-30]. Таким образом, количество микроносителей, созданных из искусственных веществ, природа которых не является животной клеткой, начало расти.

Микроносители отличаются друг от друга по свойствам, составу материала, размеру, адгезионным свойствам поверхности, зарядам. Во время исследовательской работы любой ученый хочет получить наилучшие результаты, используя универсальный тип. Основываясь на результатах исследования на микроносители, которые содержат материал животного происхождения (коллаген) прикрепление клеток происходило быстро по сравнению другими микроносителями.

Заключение. Микроносители Cytodex-1 и

Cytodex-3 по сравнению с микроносителями Hellix, Plastic, Plastic plus, Collagen, Fact III показали высокий результат по прикрепляемости к ним клеток. Использование микроносителей Cytodex-1, Cytodex-3 в качестве подложки не отражается на морфологии клеток и на особенностях их репродукции и могут быть использованы в процессе крупномасштабного культивирования клеток Vero. Повторному использованию поддаются микроносители Cytodex-1, которые не имеют белкового покрытия (коллаген).

Литература:

1. Хапчаев Ю.Х., Клеблеева Т.Д., Попова В.Д. и др. Культивирование клеток линии Vero и вакцинных штаммов вируса полиомиелита (штаммы А.Сэбина) в условиях псевдосуспензии в полупромышленном биореакторе // Журнал Биотехнология. 1999. №6. С. 45-50.
2. Кислых В.И., Рамазанов Ю.А., Майстренко В.Ф., Мертвцов Н.П. // Вихревой биореактор «БИОК». I. Опыт культивирования штамма E.coli BL21 (DE3) pZZSA, продуцирующего рекомбинантный ангионин человека // Журнал Биотехнология. 2000. №4. С.72-79.
3. Грачев В.П., Хапчаев Ю.Х., Клеблеева Т.Д., Попова В.Д. и др. Оценка экспериментальных серий живой вакцины против полиомиелита, изготовленных на перевиваемой линии клеток Vero с использованием биореакторной технологии // Журнал Биотехнология. 2001. №1. С.44-47.
4. Бакулева Н.В., Щурихина В.В., Шарова О.И., Шквыря Н.С. Культивирование вируса клещевого энцефалита в биореакторе с газовыхревым перемешиванием // Распечатано из Веб.сайта www.cbio.ru/v5/modules/news/05.04.2006.
5. Mozdanzowska K. et al. *Virology*, 1999, 254,138.
6. Романенко В.Ф., Граматова Л.Н., Онуфриев В.П., Сюрин В.Н. // Вопросы вирусологии №6, 1967.
7. *Animal tissue culture advances in technique*. Edited by Gerald D. Wasley – London Butterworths. 1972.
8. *Культуры клеток и биореакторы (часть 1)* // Распечатано из Веб.сайта www.fermenter.ru/content/page_175_0.html 05.04.-2006.
9. Alfred R., Radford J., Fan J., Boon K., Krawetz R., Rancourt D., Kallos M.S. Efficient suspension bioreactor expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers in serum-free medium, *Biotechnol. Prog.* 27(2011) 811-823, <https://doi.org/10.1002/btpr.591>.
10. Bock A., Sann H., Schulze-Horsel J., Genzel Y., Reichl U., Möhler L. Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures, *Biotechnol. Prog.* 25(2009)1717-1731. / <https://doi.org/10.1002/btpr.262>.
11. S.P. Forestell, N. Kalogerakis, L.A. Behie, D.F. Gerson, Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992). 305–313, <https://doi.org/10.1002/bit.260390308>.
12. Prem Kumar A.A., Bhaskara Rao Y.U., Joseph A.L.W., Mani K.R., Swaminathan K. Process standardization for optimal virus recovery and removal of substrate DNA and bovine serum proteins in Vero cell derived rabies vaccine. *J Biosci Bioeng* 2002; 94: 375-83.
13. Montagon B.J., Fanjet B., Nicolas A.J. The large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production: preliminary studies for killed poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand* 1981; 47:55–64.
14. Duchene M, Peetermans J, D'Hondt E, Harford N, Fabry L,

- Stephenne J. Production of polio vaccines: past, present and future. *Viral Immunol* 1990; 3:243–72.
15. Vincent-Falquet J.C., Peyron L., Souvras M., Moulin J.C., Tektoff J., Patet J. Qualification of working cell banks for the vero cell line to produce licensed human vaccines. *Dev Biol Stand* 1989; 70:153-6.
 16. Horaud F. Absence of viral sequences in the WHO-Vero cell bank: a collaborative study. *Dev Biol Stand* 1992; 76:43–6.
 17. Montagnon B.J., Vincent-Falquet J.C., Saluzzo J.F. Experience with Vero cells at Pasteur Merieux Connaught. *Dev Biol Stand* 1999; 98:137-40.
 18. World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO Technical Report Series, vol. 878. Geneva: WHO; 1998. p. 20-53 [Annex 1].
 19. Kistner O., Barrett P., Mundt W., Reiter M., Schober-Bendixen S., Eder G., Dorner F. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* - 1999. V. 98. P. 101-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494963>
 20. Barrett P., Mundt W., Kistner O., Howard M. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* - 2009. V.8. P. 607-618. DOI: 10.1586/erv.09.19
 21. Montagnon B.J., Fanget B., Vincent-Falquet J.C. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of vero cells on microcarrier. *Clin. Infect. Dis.* - 2004. V.6. P. 341-344. DOI: 10.1093/clinids/6.Supplement2.S341
 22. Montagnon B., Vincent-Falquet, J.C. Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. *Dev. Biol. Stand.* – 2003. V.55. P. 37-42 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6677539>
 23. Montagnon B.J., Vincent-Falquet J.C., Saluzzo J.F. Experience with vero cells at Pasteur Mérieux Connaught. *Dev. Biol. Stand.* – 1999. V.98. P. 137-140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494966>
 24. Sart S.N. Agathos Large-scale expansion and differentiation of mesenchymal stem cells in microcarrier-based stirred bioreactors. S. Turksen (Ed.), *Bioreactors in Stem Cell Biology*, Humana Press, New York, NY. - 2015. -V. 87. P.101-102. DOI: 10.1007/7651_2015_314
 25. Tamura A., Kobayashi J., Yamato M., Okano T. Temperature-responsive poly (N-isopropylacrylamide)-grafted microcarriers for large-scale non-invasive harvest of anchorage-dependent cells. *Biomaterials.* - 2012. - V.33. P. 3803-3812. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.060
 26. Tavassoli H., Alhosseini S.N., Tay A., Chan P.P.Y., Oh S.K.-W., Warkiani M.E. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: a biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials.* - 2018. - V.181. P. 333-346. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.016
 27. Dame M.K., Varani J. Recombinant collagen for animal product-free dextran microcarriers, *In Vitro Cell Dev. Biol. - Anim.* – 2009. - V.44. P. 407-414. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9139-4>.
 28. Badenes S.M., Fernandes T.G., Miranda C.C., Pusch Klein A., Haupt S., Rodrigues C.A.A.V., Diogo M.M., Brüstle O., Cabral J.M.M.S. Long-term expansion of human induced pluripotent stem cells in a microcarrier-based dynamic system. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* - 2017. - V.92. P. 492-503. DOI: 10.1002/jctb.5074
 29. Fan Y., Hsiung M., Cheng C., Tzanakakis E.S. Facile engineering of xeno-free microcarriers for the scalable cultivation of human pluripotent stem cells in stirred suspension. *Tissue Eng. Part A.* - 2013. - V. 20. P. 1-43. DOI:10.1089/ten.TEA.2013.0219
 30. Lam A.T.-L., Li J., Chen A.K.-L., Reuveny S., Oh S.K.-W., W.R. Birch Cationic surface charge combined with either vitronectin or laminin dictates the evolution of human embryonic stem cells/microcarrier aggregates and cell growth in agitated cultures. *Stem Cells Dev.* - 2014.- V. 23. P. 1688-1703. DOI: 10.1089/scd.2013.0645.