

# Сравнение культуральных сред для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека как объекта исследования и производственного культивирования

О.А. Григорьева<sup>1,2</sup>, Н.А. Басалова<sup>1</sup>, И.О. Коробкина<sup>1</sup>, В.Н. Бирюкова<sup>1,2</sup>, П.И. Макаревич<sup>1-3</sup>

- <sup>1</sup> Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27, к. 10, Россия
- <sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27, к. 1, Россия
- <sup>3</sup> ООО «Генная и клеточная терапия», 119234, Москва, тер. Ленинские Горы, д. 1 стр. 77, Россия

Адрес для корреспонденции: [makarevichpi@my.msu.ru](mailto:makarevichpi@my.msu.ru)

## Аннотация

Выбор условий культивирования клеточных линий является лимитирующим фактором для процедур получения, размножения клеток *in vitro*, а также для разработки лекарственных препаратов на их основе. В данной работе мы проанализировали характеристики первичных линий мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, полученных из жировой ткани, выделенных и культивированных в среде роста с добавлением сыворотки AdvanceSTEM™ (Cytiva) и бессывороточной среде CellCor™ Serum free CDM for hMSC (Xcell). Использование двух типов сред позволяло получить жизнеспособные клеточные линии МСК из жировой ткани человека. При этом скорость пролиферации в бессывороточной среде оказалась выше, что выражалось в укорочении PDT, lag-фазы, времени между пассажами как при культивировании свежесывороточных клеток, так и после разморозки линий, изначально культивированных на среде с сывороткой. Однако использование стандартного протокола криоконсервации клеток, выделенных и культивированных на среде CellCor™, не позволило эффективно выводить эти линии из разморозки. Кроме того, была обнаружена склонность МСК собираться в кластеры при использовании этой среды, что свидетельствует о необходимости дальнейшего подбора условий работы с ней. МСК являются одними из наиболее перспективных клеток для разработки продуктов для регенеративной медицины, в частности за счет секретируемых этими клетками белков. Концентрации факторов роста VEGF, IGF, HGF и ангиопоэтина-1 в кондиционированной клетками среде роста значительно не отличались при культивировании в двух средах. Также не было обнаружено статистически значимых различий в концентрации и размерах внеклеточных везикул в среде. Таким образом, применение бессывороточной среды CellCor™ позволяет освободиться от ксеногенных продуктов и может уменьшить время наработки клеточной массы МСК, что является важным параметром при разработке клеточных продуктов, не изменяя секреторные свойства этих клеток по сравнению с культивированием в среде AdvanceSTEM™, однако требуется дальнейший подбор условий для оптимизации протоколов.

**Ключевые слова:** культуральная среда, МСК, клеточная культура, жировая ткань

**Конфликт интересов:** П.И. Макаревич является генеральным директором ООО «Генная и клеточная терапия» и членом редколлегии журнала «Регенерация органов и тканей» с 2023 года, но не имеют отношения к решению о публикации данной статьи. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

**Для цитирования:** Григорьева О.А., Басалова Н.А., Коробкина И.О., Бирюкова В.Н., Макаревич П.И. Сравнение культуральных сред для мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека как объекта исследования и производственного культивирования. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(2):46–58. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-46-58>

Поступила 11.05.2024

Обработана 06.06.2024

Принята к публикации 15.06.2024

## Comparison of culture media for human adipose tissue mesenchymal stromal cells as an object of research and industrial cultivation

Olga A. Grigorieva<sup>1,2</sup>, Nataliya A. Basalova<sup>1</sup>, Irina O. Korobkina<sup>1</sup>, Victoria N. Biryukova<sup>1,2</sup>, Pavel I. Makarevich<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lomonosovsky prospect 27, b. 10, Russia, 119192

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Lomonosovsky prospect, 27, b. 1, Russia, 119192

<sup>3</sup> LLC “Gene and cell therapy”, Moscow, ter. Leninskie gory, 1, b. 77, Russia, 119234

Correspondence address: [makarevichpi@my.msu.ru](mailto:makarevichpi@my.msu.ru)

### Abstract

The choice of cell culturing conditions is a limiting factor for the procedures of obtaining and expanding cells in vitro, as well as for developing drugs based on them. In this work, we analyzed the characteristics of primary human mesenchymal stromal cell (MSC) lines obtained from adipose tissue, isolated and cultured in a growth medium supplemented with AdvanceSTEM™ serum (Cytiva) and a serum-free medium CellCor™ Serum free CDM for hMSC (Xcell). The use of two types of media made it possible to obtain viable MSC cell lines from human adipose tissue. At the same time, the proliferation rate in the serum-free medium was higher, which was expressed in shortening of PDT, lag phase, time between passages, both during cultivation of freshly isolated cells and after defrosting of lines initially cultured in a medium with serum. However, the use of a standard cryopreservation protocol for cells isolated and cultured in CellCor™ medium did not allow for the effective recovery of these lines from thawing. In addition, a tendency for MSCs to form clusters was found when using this medium, indicating the need for further selection of working conditions with it. MSCs are among the most promising cells for the development of products for regenerative medicine, in particular, due to the proteins secreted by these cells. The concentrations of growth factors VEGF, IGF, HGF and angiopoietin-1 in the cell-conditioned growth medium did not differ significantly when cultured in the two media. Also, no statistically significant differences were found in the concentration and size of extracellular vesicles in the medium. Thus, the use of the serum-free CellCor™ medium allows for the elimination of xenogenic products and can reduce the time of MSC cell mass production, which is an important parameter in the development of cell products, without changing the secretory properties of these cells compared to cultivation in the AdvanceSTEM™ medium, however, further selection of conditions is required to optimize the protocols.

**Keywords:** growth medium, MSCs, cell culture, adipose tissue

**Conflict of interests:** P.I. Makarevich is the CEO of “Gene and cell therapy” LLC and the editorial board member of the journal “Regeneration of Organs and Tissues” since 2023, but had no role in the decision to publish this article. The article has undergone the peer-review procedure adopted by the journal. The authors have declared no other conflicts of interest.

**For citation:** Grigorieva O.A., Basalova N.A., Korobkina I.O., Biryukova V.N., Makarevich P.I. Comparison of culture media for human adipose tissue mesenchymal stromal cells as an object of research and industrial cultivation. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(2):46–58. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-2-46-58>

Received 11.05.2024

Revised 06.06.2024

Accepted 15.06.2024

### Список сокращений

**ВВ** — внеклеточные везикулы

**ИФА** — иммуноферментный анализ

**МСК** — мезенхимные стромальные клетки

**ЭДТА** — этилендиаминтетрауксусная кислота

**Angiopoetin-1** — ангиопозтин 1-го типа

**HGF** — фактор роста гепатоцитов

**IGF** — инсулиноподобный фактор роста

**PDT** — время удвоения популяции

**VEGF** — фактор роста эндотелия сосудов

### Введение

Культуры и линии первичных клеток широко применяются для детального изучения механизмов внутриклеточных процессов, оценки терапевтической эффективности и безопасности фармацевтических препаратов, анализа патогенеза, диагностики и терапии различных заболеваний [1]. Несмотря на непрерывное развитие науки и медицины, существуют патологии, для которых доступные терапевтические методы длительное время казались исчерпанными. Однако с постепенным укреплением в мире новой области биомедицины — регенеративной медицины, направленной на восстановление утраченных функций организма за счет активации эндогенных регенераторных ресурсов организма, появились перспективы для персонализированной терапии и инновационных подходов к лечению таких заболеваний с использованием клеток человека и продуктов на их основе [2]. Ключевую роль в получении продуктов на основе клеток человека для регенеративной медицины играют реагенты и расходные материалы, качество которых должно обеспечить высокую эффективность и безопасность препарата.

Одним из ключевых компонентов, определяющих успех культивирования, является питательная среда, способная обеспечить наиболее благоприятные контролируемые условия для культивирования клеток и, следовательно, наработки клеточного продукта высокого качества. Среда культивирования должна в жидкой форме заменить естественную среду клеток, выступая в роли источника энергии, кислорода и других веществ, поддерживая солевой баланс и pH и удерживая метаболиты и остатки клеточного дебриса [3].

В настоящее время одним из наиболее популярных клеточных типов, используемых для исследований в области регенеративной биомедицины и создания тканеинженерных и клеточных продуктов, стали мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделяемые из различных тканей и органов. Несмотря на их высокий регенераторный потенциал, обусловленный их физиологическими функциями [4–6], в настоящее время не существует достаточного количества стандартизованных культуральных сред для их масштабной

наработки. Более того, в значительной степени устоялся и тренд на уход от ксеногенных продуктов (сыворотки крупного рогатого скота) и активное продвижение в сторону бессывороточных сред с химически определенным составом. В связи с этим мы провели анализ и в рамках дальнейшего расширения работ в сторону трансляционных исследований предложили для использования среду CellCor™ Serum free CDM for hMSC компании XCell (Южная Корея). Эта бессывороточная среда с химически определенным составом позиционируется производителем как оптимальная для культивирования и масштабирования производства МСК человека. Настоящее исследование представляет собой экспериментальную оценку ее свойств для критических этапов работы с МСК: их выделения, культивирования, криоконсервации и получения препарата их секретом, содержащего факторы роста и внеклеточные везикулы (ВВ), в сравнении со специализированной средой, поддерживающей пролиферацию недифференцированных МСК человека в культуре, которая используется с добавлением сыворотки.

## Материалы и методы

### Источник жировой ткани и этическое одобрение исследования

Все описанные исследования были проведены на базе Медицинского научно-образовательного Института МГУ (МНОИ МГУ). Перед проведением инвазивных процедур было получено информированное согласие доноров на забор биологического материала, выделение клеток и их использование в экспериментах. Все процедуры с использованием образцов тканей пациентов были выполнены в соответствии

с Хельсинкской декларацией и были одобрены комитетом по этике МГУ имени М.В. Ломоносова (IRB00010587), протокол № 4 (2018). Всего было получено 3 линии МСК жировой ткани человека.

### Культуральные среды

Экспериментальная работа была направлена на оценку критических параметров МСК жировой ткани человека при культивировании в двух средах роста. В качестве контрольной была использована среда AdvanceSTEM™ (Cytiva, США), которая используется с добавлением сыворотки. Данная среда рекомендована производителем для культивирования недифференцированных МСК человека и успешно используется в нашем коллективе для данной задачи [7, 8] (табл. 1).

### Выделение МСК

МСК жировой ткани человека выделяли по стандартному протоколу [9] из одинакового объема ткани (для каждого донора) в параллели. Образец ткани механически измельчали в стерильных условиях, помещали в раствор, содержащий 200 ед/мл коллагеназы I типа (Worthington, США) и 40 ед/мл диспазы (Corning, США), на 30–60 минут при 37 °С. После этого к смеси добавляли объем полной среды роста, равный объему использованного фермента, и центрифугировали при 200 g 10 минут. Полученный осадок ресуспендировали в соответствующей среде роста, фильтровали через клеточный фильтр с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell Strainer) и высаживали в чашки Петри подходящего диаметра в примерной концентрации 10<sup>4</sup> кл./см<sup>2</sup>. Выделенные клетки культивировали в стандартных условиях при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

Таблица 1. Перечень используемых сред для культивирования

Название, производитель	Каталожный номер	Описание	Добавки
Тестируемая среда CellCor™ Serum free CDM for hMSC, XCell (Южная Корея)	YSP002	Бессывороточная питательная среда с идентифицированным химическим составом, синтезированная для культивирования МСК человека	Антибиотик (Gibco, 15140122)
Контрольная среда AdvanceSTEM™, Cytiva (США)	SH30879.01	Специализированная питательная среда для культивирования недифференцированных МСК человека	Заменитель сыворотки (10% смесь факторов роста (AdvanceSTEM™ Cell Growth Supplement, HyClone™, SH30878.01), антибиотик

### Криоконсервация, вывод МСК из заморозки и оценка жизнеспособности

Криоконсервацию МСК жировой ткани человека, культивируемых в стандартных условиях, осуществляли на втором пассаже. Клетки открепляли с помощью последовательной обработки раствором Версена («ПанЭко»), а затем TrypLE (Gibco), осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут и ресуспендировали в среде для криоконсервации Synth-a-Freeze (Gibco) в концентрации  $10^6$  кл./мл. Суспензию помещали в криоприбирки, которые переносили в штатив для заморозки CoolCell (Corning). Далее штатив переносили в кельвинатор ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) на 24 часа, после чего пробирки помещали в автоматизированное криохранилище, где их хранили в парах жидкого азота. Размораживали клетки по стандартному протоколу в параллели, высаживали на тестируемую или контрольную среду роста. Через 24 часа определяли эффективность разморозки оценкой жизнеспособности путем открепления клеток и подсчета с окрашиванием трипановым синим. Жизнеспособность (via) клеточной линии определяли по формуле:

$$\text{Via} = \left( \frac{\text{количество жизнеспособных клеток}}{\text{общее количество клеток}} \right) \times 100\%.$$

### Оценка времени удвоения с помощью системы Incucyte Zoom

На втором пассаже после выделения или следующем пассаже после разморозки МСК высаживали в культуральные планшеты в концентрации 4000 кл./см<sup>2</sup>. Планшет помещали в автоматический анализатор IncucyteZOOM или BioTek Cytation. В IncucyteZOOM осуществляли цейтраферную съемку в течение 7 дней каждый час. На полученных микрофотографиях с помощью программного обеспечения анализировали площадь конфлюента, занятую клетками, и время появления первых митозов. Для анализа в системе BioTek Cytation в выбранные временные промежутки добавляли флуоресцентную метку Hoechst для мечения ядер и, используя программу Gen5, подсчитывали количество клеток по количеству меченых ядер. На основании полученных данных строили кривую роста клеточной линии и определяли время lag-фазы. Время удвоения популяции (PDT) рассчитывали на линейном участке логарифмической фазы кривой роста по формуле

$$\text{PDT} = t / [\log_2(N/N_0)],$$

где  $t$  — время прироста популяции,  $N_0$  — исходное число клеток (площадь, занятая клетками),  $N$  — число клеток (площадь, занятая клетками) через время  $t$ .

### Получение кондиционированной среды, оценка содержания белковых факторов роста и внеклеточных везикул

Образцы клеточной линии высаживали в одинаковой концентрации — 20 000 кл./см<sup>2</sup>. Через сутки после посадки в среду культивирования отбирали культуральную среду, после чего отмывали трижды раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия) и добавляли порцию среды DMEM (Gibco, США) с низкой глюкозой без фенолового красного. Инкубировали клеточные линии в течение 30 мин (для анализа фона) и 2 суток (для получения кондиционированной среды, обогащенной внеклеточными везикулами) или 7 дней (для получения кондиционированной среды, обогащенной факторами роста), после чего собирали кондиционированную клетками среду. Центрифугировали образцы среды при 300 g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, отбирали супернатант. Полученные образцы сохраняли при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа уровня белковых факторов роста (VEGF, HGF, IGF, Angiopoetin-1) и концентрации внеклеточных везикул. Уровень секретируемых факторов оценивали методом ИФА с помощью коммерческих наборов (R&D) согласно инструкции производителя. Определение размера и количества частиц во фракции, обогащенной внеклеточными везикулами, с помощью метода анализа траектории наночастиц было выполнено с помощью прибора ZetaView (Particle Metrix, Германия). Регистрировали параметры для фонового и экспериментального образцов, рассчитывали изменение значений концентрации наночастиц между образцами. Для обработки результатов использовали приложение ZetaView Analyzer (Particle Metrix, Германия).

### Статистическая обработка

Описательные статистики рассчитывались в пакете GraphPad Prism, данные приведены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

### Результаты

**Эффективность выделения МСК жировой ткани**  
Всего были выделены культуры клеток из жировой ткани трех пациентов. Оценку морфологии клеток проводили на 1–3–5-е сутки после вы-

деления — визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 1А). Оценку количества выделившихся клеток проводили путем подсчета числа клеток на микрофотографиях в 3–5 полях зрения на 1–3-и сутки после выделения (табл. 2). Для оценки скорости роста 0 пассажа определяли время после выделения до первого пассирования. Оценку жизнеспособности проводили при первом пассировании методом окрашивания трипановым синим и подсчетом числа жизнеспособных клеток.

Значительных различий в эффективности выделения, жизнеспособности полученных клеточных линий и скорости роста между клетками в контрольной и тестируемой средах выявлено не было. Был сделан вывод о возможности использования тестируемой среды для получения первичных культур МСК человека из жировой ткани.

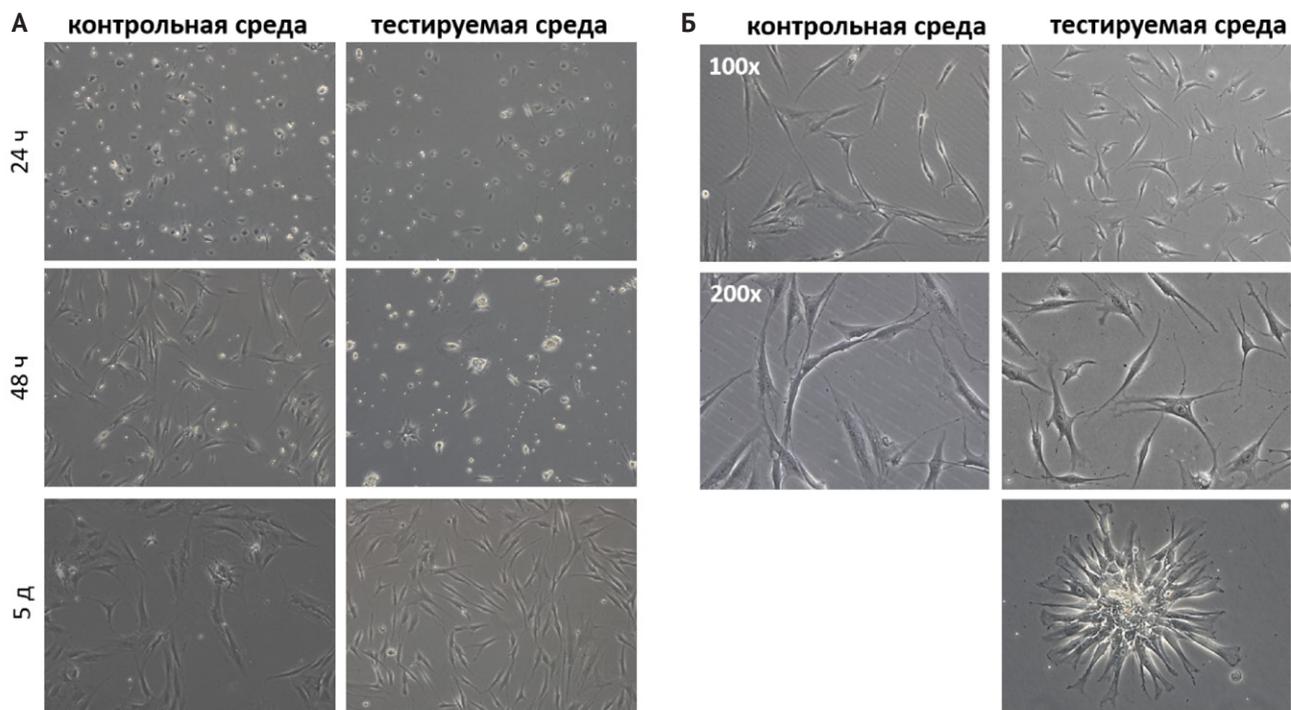
Поскольку выделение клеток на тестируемой среде происходило эффективно, клеточные линии, выделенные на тестируемой и контрольной средах, культивировали до второго пассажа. При культивировании на тестируемой среде

**Таблица 2.** Оценка эффективности выделения МСК жировой ткани в тестируемые среды

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
Количество выделившихся клеток, кл./п. зр.	79 ± 20	81 ± 21
Время от выделения до 1 пассирования, дни	6,0 ± 1,0	6,5 ± 0,5
Жизнеспособность, %	95,7 ± 4,0	94,5 ± 0,5

клетки меньше распластывались по поверхности культуральной посуды, а также обладали тенденцией спонтанно после пассирования формировать «кластеры» (рис. 1Б).

Таким образом была показана возможность культивирования выделенных из жировой ткани человека МСК на тестируемой среде культивирования до второго пассажа, при этом наблюдалось уменьшение размера и степени расплывчатости клеток, а также была отмечена тенденция МСК спонтанно образовывать «кластеры» при культивировании в тестируемой среде.



**Рис. 1.** Репрезентативные микрофотографии клеточной линии МСК жировой ткани человека. Фазово-контрастная микроскопия: А — 0 пассаж, через 1, 3 и 5 суток культивирования при выделении и культивировании в контрольной и тестируемой среде роста. Увеличение  $\times 100$ ; Б — 1-й пассаж, при культивировании в контрольной и тестируемой среде роста. Увеличение  $\times 100$  и  $\times 200$  соответственно

### Оценка эффективности заморозки после культивирования на контрольной и тестируемой средах

Осуществляли криоконсервацию по стандартному протоколу линии МСК 2–3-го пассажа, культивируемых в стандартных условиях или в тестируемой среде, в количестве 3–4 ампул.

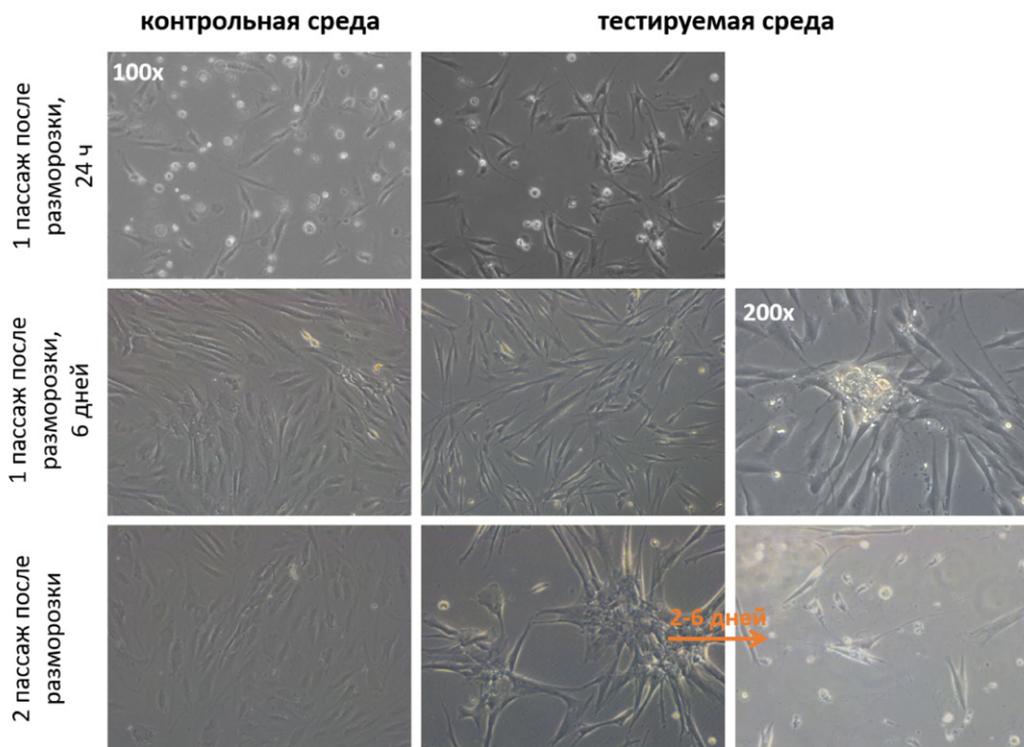
Через 24 часа определяли эффективность заморозки путем открепления клеток и подсчета с окрашиванием трипановым синим. Мы показали, что выживаемость клеток после разморозки значимо не различалась. Вновь было отмечено, что клетки в тестируемой среде имели тенденцию собираться в кластеры и снижали пролиферативную активность. У всех трех доноров наблюдали гибель клеток в тестируемой среде через 2–6 дней после разморозки (рис. 2).

Таким образом, линии МСК жировой ткани человека, выделенные и культивированные до момента заморозки на тестируемой среде роста, не удастся успешно вывести после криоконсервации и криохранения по стандартному

протоколу. Возможно, требуется подбор нового протокола заморозки или другого раствора для криопротекции.

### Эффективность вывода из заморозки МСК жировой ткани, выращенных с использованием контрольной среды

Поскольку после криоконсервации на тестируемой среде не был достигнут удовлетворительный результат, мы протестировали возможность разморозки клеточных культур из полученных ранее на контрольной среде коллекций (Биобанк Центра регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, <https://human.depo.msu.ru>,  $n = 3$ ). Жизнеспособность клеточной линии на тестируемой среде через сутки после разморозки в среднем оказалась на 10% ниже ( $69,3 \pm 7,4\%$ ), чем в контрольной среде ( $79,2 \pm 4,3\%$ ). Кроме того, мы вновь обнаружили описанную после выделения МСК из ткани тенденцию клеток собираться в «кластеры» при культивировании в тестируемой среде. Таким образом, данную способность МСК сохраняли и после этапа криоконсервации. Морфология клеток



**Рис. 2.** Репрезентативные микрофотографии клеточной линии МСК жировой ткани человека, 1-й и 2-й пассаж после разморозки при культивировании в контрольной и тестируемой средах роста. Оранжевая стрелка указывает на репрезентативную микрофотографию, отображающую изменение морфологии клеток в тестируемой среде роста через 2–6 дней после культивирования на 2-м пассаже после разморозки. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение  $\times 100$  и  $\times 200$  соответственно

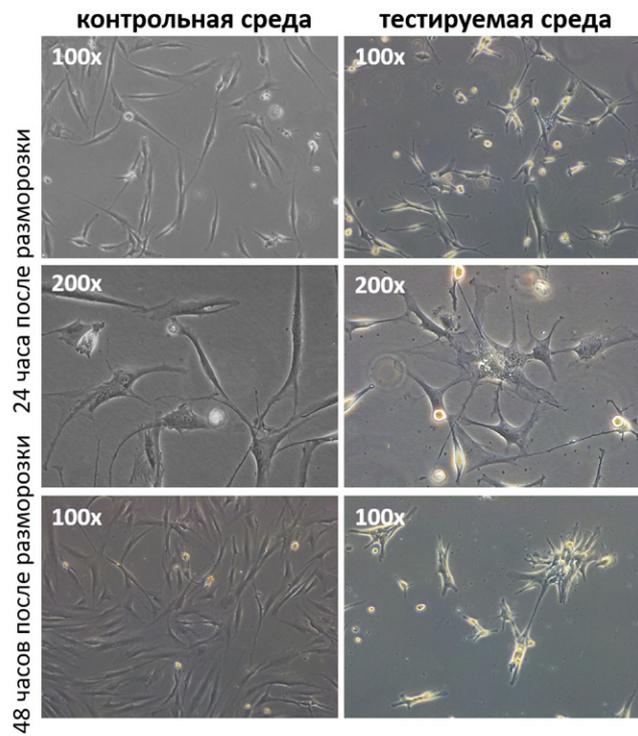
через 24 и 48 часов после разморозки представлена на рисунке 3.

### Эффективность культивирования МСК жировой ткани

После разморозки осуществляли культивирование клеток с использованием контрольной и тестируемой среды до 7–8-го пассажа, контролируя параметры морфологии (визуальное наблюдение) и скорости роста клеточной линии (продолжительность роста пассажа с момента адгезии до пассирования при достижении плотности 80–90%) (рис. 4). Время от посадки до следующего пассирования в среднем было меньше в тестируемой среде, в то время как количество клеток, которое снимали с чашки при достижении плотности 80–90%, было выше, что говорит о более высокой скорости пролиферации в тестируемой среде по сравнению с контрольной (табл. 3). При этом в тестируемой среде клетки занимают меньшую площадь (меньше распластываются) по сравнению с контрольной средой и имеют тенденцию сбиваться в «кластеры» (рис. 4).

На следующем пассаже после разморозки анализировали скорость пролиферации клеточных линий с помощью автоматизированного анализатора. При культивировании в тестируемой среде время удвоения популяции и длительность лаг-фазы оказалась меньше, то есть выделенные клетки значительно быстрее пролиферировали по сравнению с контрольной средой (табл. 4).

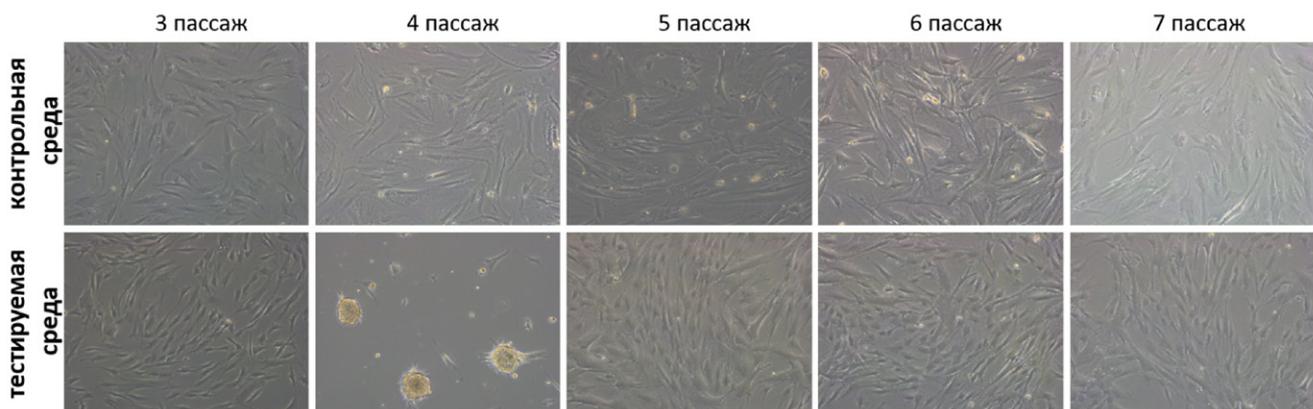
Таким образом, при выведении из разморозки на тестируемую среду МСК жировой ткани человека имели жизнеспособность в среднем ниже на 10% по сравнению с контрольной средой, более



**Рис. 3.** Репрезентативные микрофотографии клеточной линии МСК жировой ткани человека через 24 и 48 часов после разморозки клеточной линии в контрольной и тестируемой средах роста. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение  $\times 100$  и  $\times 200$  соответственно

**Таблица 3.** Оценка эффективности длительного культивирования МСК в тестируемых средах после криоконсервации

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
Среднее время от посадки до пассирования, дни	$8,9 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$
Среднее количество клеток, тыс. кл.	$153 \pm 36$	$234 \pm 65$



**Рис. 4.** Репрезентативные микрофотографии морфологии клеточной линии МСК жировой ткани человека 3–7-го пассажа после разморозки и культивирования в контрольной и тестируемой средах роста. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение  $\times 100$

**Таблица 4.** Параметры пролиферативной активности МСК после разморозки

Показатель	Контрольная среда	Тестируемая среда
PDT, ч	91,4 ± 20,8	51,6 ± 20,9
Время lag-фазы, ч	26,0 ± 2,6	17,3 ± 1,2

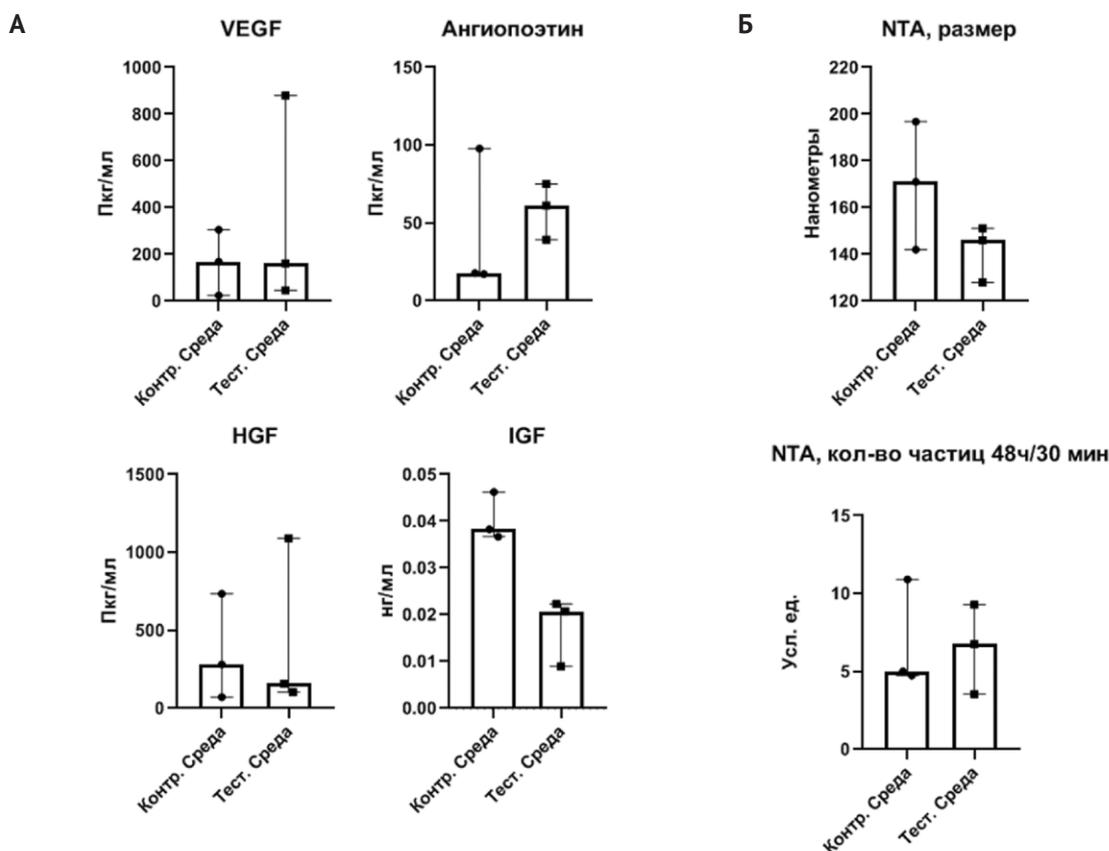
высокую скорость пролиферации, что выражалось в снижении времени удвоения популяции в 1,8 раза и времени lag-фазы в 1,5 раза, снижении времени между посадкой и пассированием между 3-м и 8-м пассажами в 1,4 раза и ростом количества клеток, открепляемых с чашки, в 1,5 раза.

#### Эффективность получения кондиционированной среды МСК, содержащей компоненты их секретомы

Одним из ключевых механизмов регенераторного действия МСК является продукция ими факторов роста, цитокинов и внеклеточных везикул (ВВ), которые способны передавать ши-

рокий спектр сигналов другим типам клеток и получили название секретомы. Кроме того, это свойство стало основой для создания целого класса биологических лекарственных препаратов, получаемых из кондиционированной среды МСК. В связи с этим мы провели оценку содержания основных факторов роста в кондиционированной среде, полученной после культивирования МСК на контрольной или тестируемой средах (рис. 5А).

Вторым важнейшим параметром является обогащение среды ВВ макромолекулярными комплексами, в том числе участвующими в переносе нуклеиновых кислот, белковых агрегатов, липидов и метаболитов между клетками и тканями. Оценка количества частиц в препаратах кондиционированной среды, полученных после культивирования МСК в сравниваемых средах, не выявила отличий (рис. 5Б). В то же время при сравнении размера частиц мы наблюдали тенденцию к уменьшению в тестируемой среде.



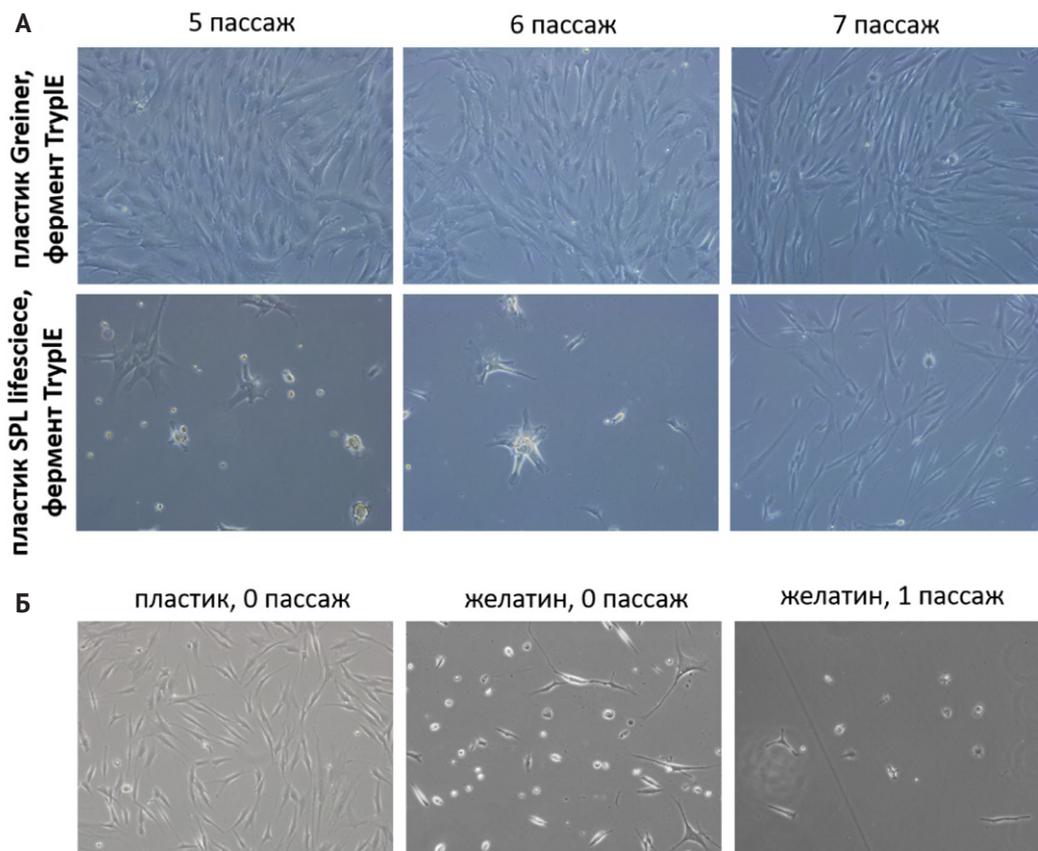
**Рис. 5.** Оценка секретируемых компонентов в кондиционированной среде МСК: А – оценка уровня секреции факторов роста МСК жировой ткани человека, культивированных на контрольной и тестируемой средах. Не было обнаружено статистически значимых различий между образцами в контрольной и тестируемой средах; Б – количество и размер внеклеточных везикул, секретируемых МСК жировой ткани, культивированных на контрольной и тестируемой средах. Не было обнаружено достоверно значимых различий между группами

Таким образом, не наблюдалось статистически значимого изменения уровня секретируемых факторов роста VEGF, HGF, IGF, ангиопоэтина-1, а также числа BV при культивировании в тестируемой среде по сравнению с контрольной. В то же время можно было отметить тенденцию к увеличению секреции ангиопоэтина-1, а также снижению содержания IGF и размера детектируемых частиц после культивирования в тестируемой среде.

#### Определение оптимальных условий для культивирования МСК

На жизнеспособность и пролиферативную активность клеточной линии помимо среды роста значительно влияние могут оказывать и другие факторы, среди которых критическими могут стать адгезивная поверхность, тип покрытия пластика, а также тип используемого раствора для дезагрегации клеток при пассировании. Учитывая трудности, с которыми мы столкнулись при разморозке (гибель клеток) и пассировании (склонность к формированию кластеров)

на тестируемой среде, мы протестировали различные варианты растворов для открепления клеток. Производитель тестируемой среды рекомендует использование TrypLE в качестве такого раствора. Мы протестировали возможность разморозки клеточной линии и ее дальнейшее пассирование в тестируемой среде с использованием раствора трипсина (0,05%) в ЭДТА (Gibco) и показали, что в таких условиях клетки получалось пассировать успешно несколько пассажей после разморозки. Кроме того, при сравнении пластика SPL Life science (Китай) и высокоадгезивного Greiner (США) в обоих случаях активная пролиферация МСК в тестируемой среде происходила при использовании раствора трипсин-ЭДТА, в то время как использование TrypLE может приводить к кластеризации МСК независимо от вида пластика (рис. 6А). По рекомендации производителя мы в ряде экспериментов покрывали пластик для культивирования раствором 0,1% стерильного желатина, однако при этом наблюдали гибель клеток в случае работы с TrypLE (рис. 6Б).



**Рис. 6.** Репрезентативные микрофотографии морфологии клеточной линии МСК жировой ткани человека после разморозки и культивирования в тестируемой среде роста. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение  $\times 100$ : А — сравнение пластика Greiner и SPL, используемого для культивирования клеток; Б — сравнение пластика и желатина

### Обсуждение и заключение

На сегодняшний день количество исследований, описывающих влияние среды культивирования на характерные свойства МСК, в том числе для их использования для производства лекарственных препаратов на основе факторов, секретируемых этими клетками (секретом), крайне ограничено. Поэтому результаты, полученные в процессе проведенной работы, позволят в будущем более эффективно оптимизировать условия культивирования МСК, в том числе для экономически выгодного производства биологических лекарственных препаратов на их основе.

Изучая влияние сред культивирования на свойства МСК, выделенных из жировой ткани человека, мы выяснили, что выделение клеток возможно на тестируемую нами среду с эффективностью, сравнимой с контрольной средой. Вместе с тем в тестируемой среде наблюдаются нехарактерные для МСК изменения в морфологии, проявляющиеся в виде спонтанной агрегации и росте в форме кластеров. Известно, что адгезия клеток к поверхности пластика происходит посредством адгезивных белков внеклеточного матрикса (фибронектина, витронектина и других), которые в большом количестве содержатся в сыворотке [10]. Адгезия клеток в бессывороточной среде может быть затруднена при недостатке таких белков. Сниженное содержание таких белков в бессывороточной среде может объяснять морфологические особенности (меньшую степень расплывания, меньшие размеры клеток и, как следствие, большую плотность клеток на 1 см<sup>2</sup>) и склонность к формированию кластеров, которые могут возникать как следствие большей склонности формировать межклеточные контакты, нежели контакты «клетка — матрикс», по сравнению с культивированием в среде с добавлением сыворотки. Возможным подходом здесь может рассматриваться предварительное покрытие культурального пластика компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген I типа, фибронектин, полилизин, или использование высокоадгезивного пластика.

Также стоит отметить, что линии, культивируемые на тестируемой среде, не сформировали культуру, пригодную к использованию после криоконсервации. Вероятно, необходим дальнейший подбор условий культивирования, например смена адгезионной поверхности, для оптимизации процесса культивирования

и предотвращения кластеризации. По нашим предварительным данным, значительное влияние на успех роста и криоконсервации МСК в тестируемой среде может иметь раствор, используемый для дезагрегации клеток.

Интересно отметить, что возможно наращивание культуры на тестируемой среде из криоколлекций, полученных на других ростовых средах, как минимум на AdvanceStem™. После криоконсервации, несмотря на сохраненную способность к спонтанному формированию кластеров, клетки в тестируемой среде характеризуются существенно (в 1,8 раза) более коротким PDT. Более того, мы отметили, что при одинаковой плотности клеток в культуре, выращенной на тестируемой среде, примерно в 1,5 раза больше, чем в контрольной. Эти факты говорят о возможности использования тестируемой среды для быстрого наращивания клеточной массы.

Вместе с тем существуют данные, что образование многоклеточных агрегатов может способствовать повышенной секреции МСК прогенераторных факторов, так как известно, что секретирующий профиль МСК может быть связан с морфологией клеток [11], а в 3D-условиях МСК способны секретировать более высокие уровни таких молекул, как VEGF, IL-11, FGF-2, ангиогенин [6, 12]. Мы показали, что наблюдаемые особенности в морфологии не сказываются на секреторной активности МСК в тестируемой среде. Так, мы показали, что статистически значимого изменения уровня секретируемых факторов роста VEGF, HGF, IGF, ангиопоэтина-1, а также числа частиц, совпадающих по размерам с ВВ при культивировании в тестируемой среде по сравнению с контрольной не происходит. Вместе с тем наблюдается уменьшение размера секретируемых частиц, что может говорить о сдвиге профиля секреции в сторону экзосомальной, но не микровезикулярной фракции.

Таким образом, с учетом отсутствия животных компонентов тестируемая среда Cellcor™ представляется оптимальным выбором для индустриального масштабирования культуры МСК, не уступая референсному аналогу AdvanceSTEM™. Другим преимуществом данной среды является быстрая пролиферация мезенхимных стромальных клеток с сохранением их фенотипа и секреторного профиля, что делает ее привлекательной для масштабирования

при производстве клеточных продуктов и препаратов на их основе. Однако требуется дальнейшее уточнение условий для подбора оптимальных протоколов культивирования.

**Финансирование:** Работы проведены в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы

благодарят ООО «Внешбиоторг» за предоставленные реагенты для ряда экспериментов.

**Funding:** The work was carried out under state assignment of Lomonosov Moscow State University. The authors express their gratitude to «Vneshbiotorg» LLC for reagent supply.

## Литература

1. Charwat V, Kasper C, Lavrentieva A. Cell Culture Technology. Cham: Springer International Publishing; Imprint: Springer; 2018.
2. Ciccocioppo R, Cantore A, Chaimov D, Orlando G. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. Intern Emerg Med. 2019;14(6):911–921.
3. Freshney RI, Capes-Davis A, Gregory C, Przyborski S. Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications. Seventh edition. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell; 2016. xxxviii, 684 p.
4. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. Cell Stem Cell. 2011;9(1):11–15.
5. Krampera M, Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Putative microenvironmental modulators become cell therapy. Cell Stem Cell. 2021;28(10):1708–1725.
6. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci. 2017;18(9), 1852.
7. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. Stem Cell Res Ther. 2015;6:221.
8. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Kalinina N, Akopyan Z, et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. Int J Mol Sci. 2019;20(7), 1656.
9. Grigorieva O, Arbatskiy M, Novoseletskaya E, Dyachkova U, Ishkin A, Kalinina N, et al. Platelet-Derived Growth Factor Induces SASP-Associated Gene Expression in Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells but Does Not Promote Cell Senescence. Biomedicines. 2021;9(10), 1290.
10. Uzman A. Molecular Cell Biology (4th edition): Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 p. ISBN 0-7167-3136-3. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2001;29(3):126-8.
11. Leuning DG, Beijer NRM, du Fosse NA, Vermeulen S, Lievers E, van Kooten C, et al. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. Sci Rep. 2018;8(1):7716.
12. Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. Stem Cells. 2007;25(7):1761–1768.

## Об авторах

**Григорьева Ольга Александровна** — к.б.н., н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; с.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Басалова Наталия Андреевна** — к.б.н., м.н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного

Григорьева О.А. и соавт.

Сравнение сред для производственного культивирования МСК

института МГУ имени М.В. Ломоносова; м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Коробкина Ирина Олеговна** — ведущий инженер Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Бирюкова Виктория Николаевна** — аспирант кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Макаревич Павел Игоревич** — к.м.н., заведующий лабораторией медицинской биоинженерии Центра регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; генеральный директор ООО «Генная и клеточная терапия».

### Authors

**Nataliya A. Basalova** — Cand. Sci. (Biology), junior research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; junior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Olga A. Grigorieva** — Cand. Sci. (Biology), research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; senior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Irina O. Korobkina** — leading engineer of the Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University.

**Victoria N. Biryukova** — post-graduate researcher, Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

**Pavel I. Makarevich** — M.D., Cand. Sci. (Medicine), head of the Laboratory of Medical bioengineering, Centre for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University; CEO at “Gene and cell therapy”, LLC.