

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК EX VIVO В РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ (обзор литературы и собственный опыт)

Т.В. Шаманская<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Осипова<sup>1,2</sup>, Б.Б. Пурбуева<sup>1,2</sup>, А.Ю. Устюгов<sup>1</sup>, Т.А. Астрелина<sup>1,2</sup>,  
М.В. Яковлева<sup>2</sup>, С.А. Румянцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,  
онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, Москва

<sup>2</sup>ГУЗ Банк стволовых клеток Департамента Здравоохранения, Москва

**Контакты:** Татьяна Викторовна Шаманская totti111@list.ru

В последнее время мезенхимальные стволовые клетки (МСК) нашли широкое применение во многих областях медицины, где используются их иммуносупрессивные свойства, влияние на процессы регенерации поврежденных тканей и т. д. В связи с этим возникает потребность в разработке стандартизированных протоколов экспансии МСК, которые позволят получить необходимое количество клеток для клинического применения без нарушения их способности к самовозобновлению и мультилинейного дифференцированного потенциала. В настоящей статье обобщены данные литературы о различных питательных средах и добавках, применяемых при культивировании ex vivo МСК. Представлен собственный опыт использования стандартной питательной среды для культивирования МСК ДМЕМ с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и бессывороточной питательной среды MesenCult MSC Basal Medium (Human) (StemCell technologies Inc) с добавлением Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Human). Проведена оценка их влияния на рост и иммунофенотипические характеристики МСК.

**Ключевые слова:** мезенхимальные клетки, экспансия, питательные среды

## EX VIVO EXPANSION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN DIFFERENT CULTURE CONDITIONS (the literature review and own experience)

T.V. Shamanskaya<sup>1,2</sup>, Ye.Yu. Osipova<sup>1,2</sup>, B.B. Purbueva<sup>1,2</sup>, A.Yu. Ustyugov<sup>1</sup>, T.A. Astrelina<sup>1,2</sup>, M.V. Yakovleva<sup>2</sup>, S.A. Rumyantsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Clinical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

<sup>2</sup>The Stem cell bank Moscow Department of Public health, Moscow

Mesenchymal stem cells (MSC) have been widely used in different areas of medicine because of their immunosuppressive properties and influence on regeneration of the damaged tissues. The improvement of MSC expansion standard protocols allowing receiving necessary MSC amount with the ability of self-renewal and multilineage differentiation potential for clinical application is required. The present article summarizes the current experience concerning uses of various culture mediums and supplements for the ex vivo MSC expansion. The author's experience of ex vivo MSC expansion using both standard medium DMEM with the supplementation of fetal bovine serum (FBS) and serum-free medium MesenCult MSC Basal Medium (Human) (StemCell technologies Inc.) with addition Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Human) is presented. The influence of medium type on MSC growth and immunophenotype is analyzed.

**Key words:** mesenchymal stem cells, expansion, culture medium

В настоящее время мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются важным инструментом для проведения клеточной терапии, так как они могут быть легко изолированы и обладают большим потенциалом для экспансии.

В клинических протоколах в среднем используется количество МСК, составляющее  $2 \times 10^6$ /кг веса пациента (например, при лечении тяжелой степени реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ)). В связи с этим появляется необходимость разработки такого протокола культивирования МСК, который позволит получить максимальное количество

клеток при минимальном числе пассажей и за минимально короткое время.

МСК могут быть получены из разных тканей (костный мозг, жировая ткань, скелетные мышцы, печень, плацента и др.), и для их культивирования применяются различные протоколы.

В настоящее время существует большая несогласованность среди лабораторий относительно выбора питательных сред и добавления разнообразных факторов для успешной изоляции и экспансии МСК. Ввиду этого и с учетом большого терапевтического потенциала МСК возникает потребность в разработ-

ке более точного и стандартизированного протокола для экспансии.

Целый ряд факторов оказывает влияние на рост МСК: основа питательной среды, концентрация глюкозы и глутамина в среде, а также плотность пассажа, свойства адгезивной поверхности и т. д. [1, 2].

Важным компонентом для успешного культивирования МСК служит выбор питательной среды. Ее основа включает в себя глюкозу, аминокислоты и ионы кальция, магния, калия, натрия и фосфаты. Наиболее часто используемые питательные среды для экспансии МСК — DMEM (среда Eagle's, модифицированная Dulbecco) и  $\alpha$ -MEM. При их применении МСК сохраняют свой мультилинейный потенциал дифференцировки и способность к самовозобновлению при последующих пассажах.

Добавками к основным питательным средам, чаще всего используемым при культивировании МСК, являются эмбриональная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum — FBS) или эмбриональная телячья сыворотка (Fetal Calf Serum — FCS). Они содержат в себе большое количество веществ, стимулирующих рост клеток (питательные вещества, факторы роста и т. д.).

В большинстве преclinical исследований предпочтение отдается МСК, выращенным в питательной среде с использованием 10–20% FCS [1, 3, 4].

Существует порядка 10 клинических протоколов, которые используют МСК, культивированные с присутствием животной сыворотки. Они показали безопасность клинического применения МСК, культивированных в среде с добавлением FCS [6, 7].

Например, в исследовании Katarina Le Blanc и соавт. для лечения стероид-резистентной формы РТПХ использовались МСК, выращенные в среде с добавлением животной сыворотки (10% FBS). Доза МСК составляла от 0,4 до  $9 \times 10^6$ /кг веса пациента. Всего было выполнено до 92 введений МСК. Некоторые пациенты получили по 2 и более инфузии. Побочных реакций не было отмечено ни во время введения МСК, ни после [8].

Применение FCS и FBS для клинических испытаний одобрено также Американским управлением по контролю за продуктами и лекарственными препаратами (U.S. Food and Drug Administration) [9].

И все же, когда ставится вопрос о клиническом применении готового продукта, сыворотка животных является нежелательным источником ксеногенных антигенов и несет риск передачи вирусов животных, прионов и т. д. Хотя, как считают некоторые исследователи, риск передачи прионов и возбудителей зоонозных инфекций при использовании сыворотки животного невелик. Поэтому, как уже было сказано выше, некоторые протоколы для экспансии МСК и дальнейшего их использования в клинике разработаны с применением FCS [7].

Кроме того, бычьи белки и пептиды могут соединяться с МСК и в дальнейшем вызывать иммунные

реакции, особенно при повторных вливаниях МСК, а также могут вызвать отторжение пересаженных клеток [9]. Как показали исследования, в  $10^8$  МСК, культивированных из костного мозга человека с добавлением FCS, находится приблизительно 7–30 мг белков животной сыворотки.

Однако некоторые авторы показали, что МСК, выращенные с применением FCS, оказались более эффективны в подавлении вызванной аллоантиген-индуцированной пролиферацией субпопуляции лимфоцитов, предполагая, что среда с содержанием FCS является подходящей для предупреждения или лечения аллореактивных иммунных осложнений [10].

Повышение иммуносупрессивных свойств МСК, культивированных в среде с добавлением животной сыворотки, может быть также связано с повышенной экспрессией гена простагландин-синтазы [11].

Таким образом, культивирование МСК с присутствием FBS может быть применимо в клинических протоколах, где используются иммуносупрессивные свойства МСК (лечение тяжелой РТПХ после проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) и/или отторжения трансплантата после ТГСК или трансплантации солидных органов).

И хотя для полной оценки клинического воздействия животных белков на организм человека необходимы дополнительные исследования, в ряде работ было показано, что использование при культивировании МСК аутологичной сыворотки (АС) вместо FCS позволило предотвратить возникновение опасных для жизни аритмий при проведении клеточной кардиоластики. В результате несколько стран запретили к использованию в клинике клеточный продукт, выращенный с использованием FCS.

Для того чтобы получить гарантированный рост МСК и подтвердить безопасность клеточного продукта, обычно проводится скрининг FCS. Однако качество сыворотки может изменяться от партии к партии, что оказывает влияние на процесс культивирования.

Как альтернатива животной сыворотке при экспансии МСК было предложено использование препаратов, приготовленных на основе крови человека, способных обеспечить растущие клетки всеми необходимыми питательными веществами и факторами роста, например лизата тромбоцитов (ЛТ) (Platelet Lysate — PL) и других производных, полученных из тромбоцитов крови человека [12], а также использование аллогенной и аутогенной человеческой сыворотки, человеческой плазмы и сыворотки пуповинной крови (ПК).

Тромбоцитарный концентрат уже использовался в хирургии и стоматологии для генерации костных структур благодаря содержанию большого количества ростовых факторов, которые можно получить путем адгезии, агрегации и лизиса тромбоцитов [13–15].

ЛТ является биологическим продуктом, содержащим высокие концентрации человеческих факторов роста в малом объеме плазмы: фактор роста тромбоци-

тов (Platelet-derived Growth Factors (PDGFs)), основной фактор роста фибробластов (Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF)), сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)), инсулиноподобный фактор роста-1 (Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)), трансформирующий фактор роста- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )) [12, 16].

Исследования, проведенные *in vitro*, показали, что содержание ростовых факторов может меняться в зависимости от концентрации тромбоцитов, способа заготовки конечного продукта, контаминации лейкоцитами и механизма выделения этих факторов [17–20].

В работах, использующих МСК, полученные из ПК, было показано, что питательные среды с добавлением ЛТ могут быть использованы для культивирования МСК и их дальнейшего применения в клинике с целью поддержания гемопоэза, иммунного регулирования и сосудистой регенерации [21].

Среды с добавлением плазмы, обогащенной тромбоцитами, пригодны также для культивирования МСК, полученных из костного мозга [3].

Клетки, полученные при экспансии с добавлением в среду ЛТ, несут все критерии, характерные для МСК (прилипание к пластику, веретенообразная форма при морфологическом исследовании, характерные иммунологические характеристики, отсутствие маркеров гемопоэтических клеток, сохраненный мультилинейный дифференцированный потенциал). Кроме того, клетки не имели цитогенетических нарушений и сохраняли свой иммунопривилегированный потенциал, подавляя аллогенную реакцию Т-лимфоцитов [22].

Использование ЛТ в качестве добавки в среду при культивировании МСК уменьшало время, необходимое для трипсинизации: в данной среде МСК быстрее отделялись от пластика. Это свойство было описано и при использовании АС [11].

Однако было продемонстрировано, что ЛТ проявляет дозозависимый эффект на рост МСК, а также обуславливает тонкие различия в морфологии культивируемых клеток. МСК имели более тонкую и вытянутую форму и росли преимущественно сгруппированно, а не равномерно распределялись по всему флакону. В ряде исследований представлено, что МСК, культивированные с добавлением ЛТ, по сравнению с МСК, выращенными с 10% FCS, показали лучшую пролиферативную способность и клоногенную активность, чем обеспечили более эффективную экспансию, сократив время культивирования (для получения МСК в количестве  $1 \times 10^6$ /кг) до 2–3 нед по сравнению с 4–5 нед при применении стандартных протоколов. Однако этот эффект был дозозависимым и максимально выраженным при экспансии с 5% концентрацией ЛТ [10, 12, 23].

МСК, культивированные с добавлением ЛТ, показали низкую иммуносупрессивную активность, и поэтому они могут быть предложены для использования в реконструктивной/генеративной клеточной терапии и в протоколах, направленных на улучшение гемато-

поэтического/иммунного восстановления после проведения ТКСК.

Недостатком этой добавки (ЛТ) является вариабельность концентрации факторов роста, связанная с эффективностью их выделения грануляциями тромбоцитов. На этот процесс могут оказывать влияние условия хранения лизата. Для получения производственной значимости в его приготовлении необходимо использование свежей плазмы, содержащей не менее  $1 \times 10^9$ /мл тромбоцитов, и использование высокоскоростного центрифугирования во избежание наличия остаточных тел тромбоцитов, особенно при аллогенном применении. Поэтому возникает необходимость в проведении дальнейших исследований для описания более полного состава факторов роста в ЛТ и оптимизации процедуры подготовки добавки и протоколов экспансии.

Альтернативой FCS в протоколах экспансии может служить человеческая сыворотка, использование которой для культивирования МСК несет в себе несколько факторов (соматотропин, инсулин и т. д.), оказывающих влияние на адипогенную дифференцировку.

Использование АС является дискуссионным вопросом из-за ее ограниченной пригодности и высокой вариабельности.

Есть некоторые данные, что применение АС для экспансии показывает лучшие результаты, чем использование животной сыворотки [24–28].

Работа Norbert Stute была первым систематическим *in vitro* исследованием, которое показало выполнимость проведения экспансии МСК в среде без FCS с добавлением АС в 3 различных концентрациях и получения достаточного количества МСК без применения каких-либо дополнительных факторов роста [24]. Авторы выяснили, что использование 10% АС показывает сопоставимые результаты с экспансией в среде с 10% FCS относительно выделения и роста клеток в кратковременных культурах, их морфологии, фенотипа, способности к самообновлению и мультилинейной дифференцировке. Однако для успешного проведения экспансии МСК необходимая концентрация АС составляет не менее 10%. Меньшие ее концентрации (например, 1% или 3%) приводят к недостаточной экспансии. В этой работе также было показано, что использование 10% АС дает лучшие результаты в отношении остеогенной дифференцировки МСК, и это может быть рекомендовано для использования при регенерации дефектов кости.

Таким образом, АС может быть пригодна лишь для клинических протоколов, где используется небольшое количество МСК (не более  $1 \times 10^6$ /кг веса пациента), что в свою очередь потребует небольшого объема периферической крови для приготовления сыворотки. Для протоколов с использованием больших количеств МСК необходимо и большее количество питательных сред, а это приведет к потребности в больших объемах периферической крови [7].

Некоторые авторы продемонстрировали эффективную экспансию с 20% АС только после первичной

экспансии с FCS. AC использовалась в дальнейшем для культивирования с целью наиболее полного очищения от бычьих белков [29].

Ограничение применения AC также связано с большой вариабельностью сыворотки (колебанием уровня ростовых факторов), особенно у пациентов, получавших химиотерапию. Koller и соавт., Kuznetsov и соавт. и Yamaguchi и соавт. показали лучшие результаты при культивировании с FCS по сравнению с AC [30, 31, 32].

Данные по применению аллогенной сыворотки/плазмы для экспансии МСК также противоречивы. Одни авторы показывают успешные результаты по применению аллогенной сыворотки для изоляции и экспансии МСК [27, 32, 33], в других работах добавление аллогенной сыворотки при культивировании вызывало быстрое старение и прекращение роста клеток [11, 31, 34].

Показаны хорошие результаты экспансии МСК в среде с добавлением замороженной человеческой плазмы и ЛТ, но только в первые 6 нед культивирования, в дальнейшем отмечалось прекращение роста и гибель клеток [3].

Как альтернатива животной сыворотке при добавлении в основную питательную среду было предложено использование ПК, которая содержит все необходимые цитокины, обеспечивающие рост различных типов стволовых гемопоэтических клеток [35].

Плацентарный трофобласт продуцирует такие факторы роста, как инсулиноподобный фактор роста (Insulin-like Growth Factor (IGF)), трансформирующий фактор роста (Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )), сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)).

P. Shetty и соавт. показали, что сыворотка ПК, полученная от нескольких доноров, поддерживает экспансию МСК, полученных из разных источников (костный мозг, пуповина) и от разных животных индивидумов (человека или свиньи). МСК, культивированные в среде с добавлением 10% FBS или 10% сыворотки ПК, имели схожую типичную морфологию и фенотип CD73+/CD105+/CD45-. При культивировании с добавлением сыворотки ПК на 3-м пассаже было получено 4,1-кратное увеличение клеток, против 2,3-кратного с FBS. Однако в дальнейшем адгезия к пластику была нарушена, в то время как в среде с FBS рост МСК продолжался в однослойных культурах и после 3-го пассажа. Возможно, FBS содержит некоторые факторы, которые обеспечивают прилипание клеток к пластику. Однако это может являться незначительным препятствием, так как некоторые клинические протоколы не требуют большого количества МСК. В этом случае возможно использование флаконов для культивирования, покрытых слоем клеточной культуры, которые улучшат адгезию клеток при использовании сыворотки ПК и позволят провести культивирование и после 3-го пассажа. Авторы считают, что преимуществом использования сыворотки ПК также является возможность ее получения от разных доно-

ров в достаточном количестве для экспансии [36].

Применение бессывороточных сред было предложено в качестве альтернативы, чтобы добиться большей безопасности при использовании МСК в клинике и избежать нежелательных инфекционных осложнений.

Химически стандартизированный состав бессывороточных сред мог бы быть хорошей альтернативой при проведении экспансии МСК. Но на настоящий момент культивирование МСК в бессывороточных питательных средах не показало больших преимуществ. И пока никакого прорыва в этой области не произошло.

Бессывороточная питательная среда без применения цитокинов и факторов роста не может вызвать рост человеческих МСК [37, 38]. Возможно, это происходит потому, что сыворотка вызывает внутриклеточные изменения концентрации кальция, которые жизненно важны для пролиферации и дифференцирования стволовой клетки [39].

Использование бессывороточной питательной среды показало поддержку роста МСК на животных моделях, но только после 2 пассажей, подкрепленных добавлением FBS [40]. И, возможно, из-за специфических разновидностей МСК человека и животных бессывороточные среды не применимы при культивировании человеческих МСК.

Были проведены работы по экспансии МСК в бессывороточной среде с добавлением субстрата (ULTROSER), включающего в себя все необходимые для роста клеток субстанции, такие как факторы роста клеток, витамины, гормоны, связывающие белки. Устойчивый качественный и количественный состав субстрата может гарантировать качество при проведении культивирования от партии к партии.

При проведении культивирования в этой бессывороточной среде процент клеток, которые несли на себе маркеры гемопоэтических клеток, был ниже, чем при культивировании в стандартной среде MEM с добавлением 15% FCS (51% против 12%). Для того чтобы удалить примесь гемопоэтических клеток при культивировании в стандартной среде, требовалось больше времени. При культивировании клеток с ULTROSER после первичного посева и 1-го пассажа было получено большее количество МСК. Уже после 1-го пассажа в среде ULTROSER было получено достаточно клеток для клинического применения (если брать из расчета  $1 \times 10^6$ /кг веса пациента). Эти клетки также сохраняли свою мультилинейность и способность поддерживать гемопоэз. Возможно, преимущество бессывороточной питательной среды было связано с наличием в ней низких концентраций инсулина, белка и трансферрина, что может играть главную роль в пролиферации клеток. Однако авторы сравнивали использование ULTROSER как добавку к питательной среде DMEM, а FBS добавлялась в среду  $\alpha$ -MEM, которая не служит наилучшей средой для культивирования. Возможно, что использование одинаковой питательной среды не показало бы преимуществ при применении ULTROSER, кроме того, такие

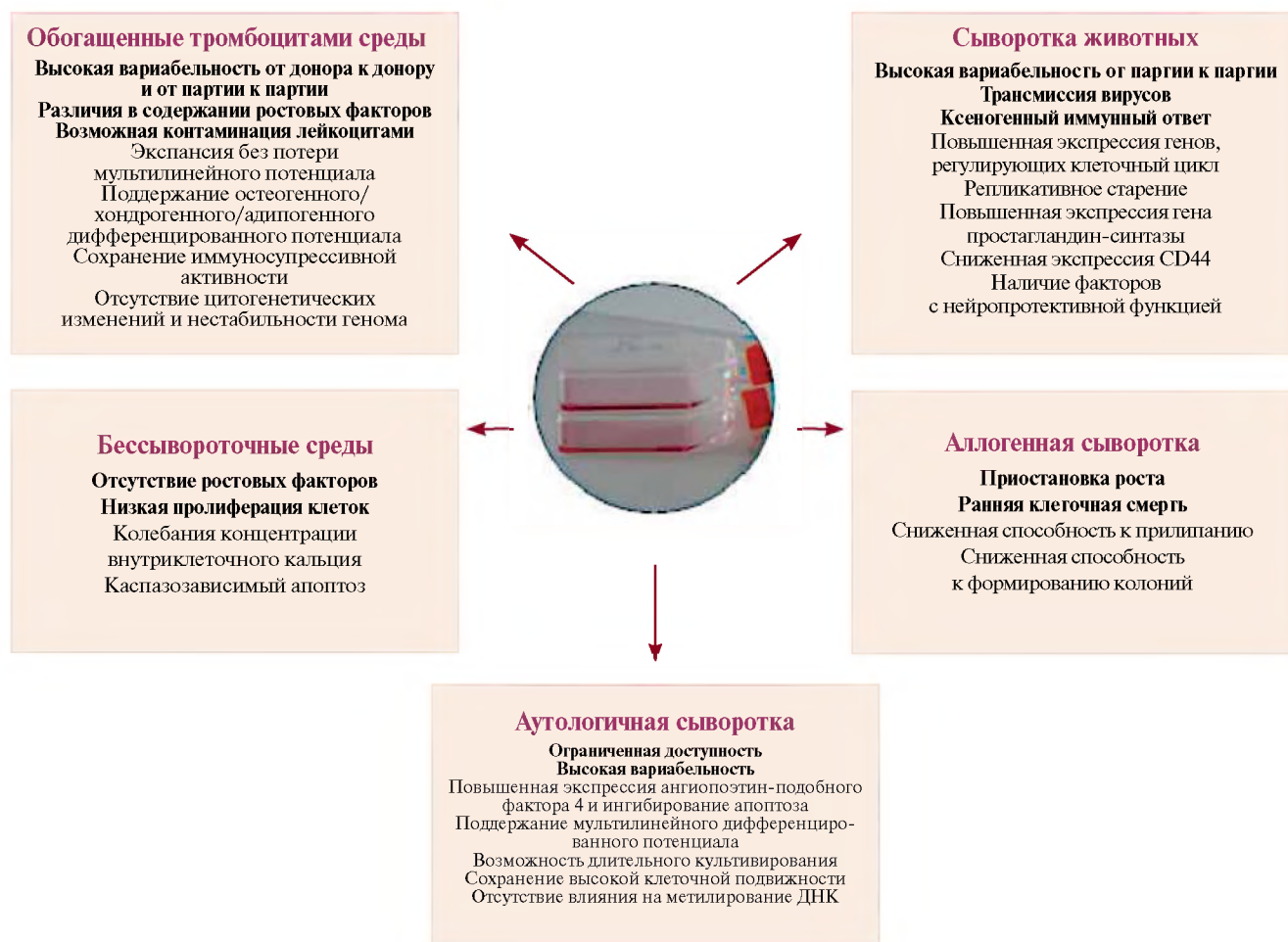


Рис. 1. Положительные и отрицательные стороны культивирования МСК при использовании различных питательных сред [42]

результаты были выявлены при использовании добавки только до 2-го пассажа, и, возможно, при продолжении культивирования ULTROSER был бы не в состоянии поддерживать рост МСК [41].

Основные особенности культивирования МСК при использовании различных питательных сред представлены на рисунке 1.

Мы в своей работе попытались провести сравнение использования различных сред для экспансии МСК (стандартная питательная среда с добавлением FCS и бессывороточная питательная среда). Мы сравнивали влияние этих сред на выход МСК, пролиферацию, различия в иммунологии.

### Изоляция и культивирование МСК

Для культивирования МСК использовался костный мозг (КМ) в объеме 20–40 мл от 6 здоровых доноров, полученный при проведении пункции подвздошной кости.

Мононуклеарные клетки были изолированы путем проведения центрифугирования по градиенту плотности при выделении на фиколе плотностью 1,077 (ООО «БиолоТ»). После 2-кратного повторного центрифугирования со средой ДМЕМ клетки были подсчитаны в камере Горяева, разделены по количеству на 3 равные

части и высажены на пластиковые флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> со средней плотностью 109,8×10<sup>6</sup>/образец (диапазон 37,5–300×10<sup>6</sup>/образец).

Для пассажа были использованы 3 варианта питательной среды:

1. Стандартная среда ДМЕМ (ООО «БиолоТ») с низким содержанием глюкозы с добавлением 20% FCS (сыворотка крови плодов коровы, ООО «БиолоТ»).
2. Бессывороточная среда MesenCult MSC Basal Medium (Human) (StemCell technologies Inc) с добавлением Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Human).
3. Бессывороточная среда MesenCult MSC Basal Medium (Human) (StemCell technologies Inc) с добавлением Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Human) и 5% FCS.

Смена среды после первичной посадки была выполнена на 2–3-й день для удаления примеси неприлипших клеток.

По достижении 70–80% конфлюэнтности, когда МСК покрывали примерно 70–80% поверхности дна флакона (14-й день), был выполнен 1-й пассаж (P1). Клетки пересаживали на новые флаконы для дальнейшего пассирования.

Всего было проведено 10 пассажей. Количество МСК подсчитывали на ранних пассажах (от P1 до P4).

Иммунофенотипическое исследование проводили на ранних (P4) и поздних пассажах (P10) с использованием следующей панели антител: CD45, CD14, CD73, CD105, CD3, CD19, CD44, CD25, CD13, CD38, CD106, Ki-67.

### Результаты работы

После 14 дней культивирования была проведена трипсинизация и 2-кратное центрифугирование с последующим подсчетом клеток. На среде №1 было получено в среднем  $4,58 \times 10^6$ /образец (диапазон 0,2–14,1), на среде №2 –  $2,08 \times 10^6$ /образец (разброс 0,1–8,1), на среде №3 –  $5,04 \times 10^6$ /образец (разброс 0,1–16) (рис. 2).

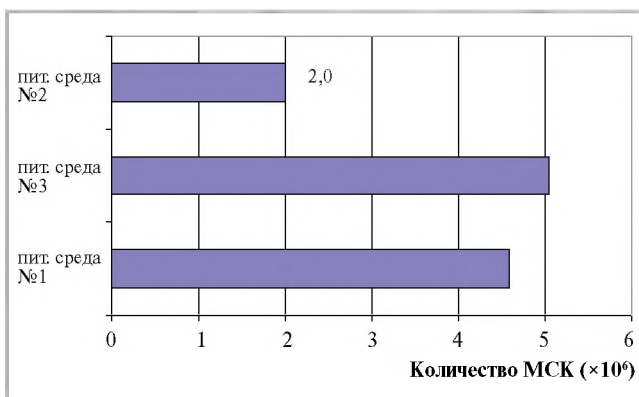


Рис. 2. Влияние культуральной среды на рост МСК. Количество МСК ( $\times 10^6$ ), полученных после 14 дней культивирования

Представленные на графике различия не являются достоверными из-за малого количества выполненных проб. Однако видно, что большее количество клеток было получено при добавлении в питательную среду для культивирования сыворотки плодов коровы.

В дальнейшем подсчет клеток проводился после

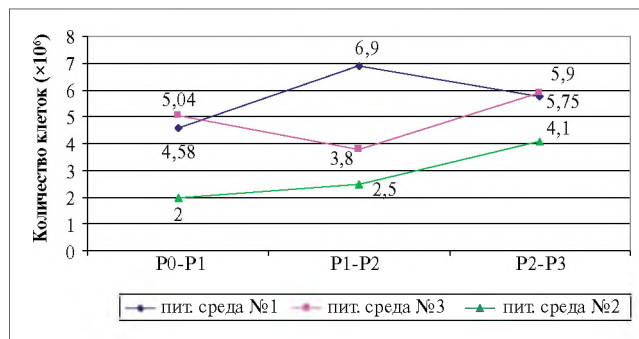


Рис. 3. Сравнение кривой роста МСК при культивировании в различных средах

каждого пассажа до P4 (рис. 3).

На рисунке 3 видно, что наименьшее количество клеток к 3-му пассажу (P3) получено при культивировании в бессывороточной среде; добавление только 5% FCS увеличивает число клеток, приближая результаты культивирования, сравнимые с культивированием с добавлением 20% FCS. Данные не являются статистически

достоверными. К 4-му пассажу на среде №1 было получено в среднем  $28,6 \times 10^6$ /МСК на образец (разброс 0,3–116,3), на среде №2 –  $3,9 \times 10^6$ /образец (разброс 0–14), на среде №3 –  $18,5 \times 10^6$ /образец (разброс 0,25–93,8).

Анализ экспрессии иммунологических маркеров МСК проводился на ранних и поздних пассажах при культивировании в стандартной среде DMEM с добавлением FCS и в среде без добавления сыворотки. Данные представлены в таблице.

Таблица. Фенотипический профиль МСК при культивировании в различных средах, %

| Иммунологические маркеры | Питательная среда №1 |       | Питательная среда №2 |       |
|--------------------------|----------------------|-------|----------------------|-------|
|                          | P4                   | P10   | P4                   | P10   |
| CD45                     | 4,78                 | 1,13  | 1,32                 | 0,5   |
| CD14                     | 0,56                 | 0,04  | 0,64                 | 0,01  |
| CD73                     | 87,03                | 78,26 | 85,1                 | 80,2  |
| CD105                    | 58,5                 | 19,25 | 43,8                 | 48,9  |
| CD3                      | 1,1                  | 0,71  | 0,72                 | 0,20  |
| CD19                     | 0,69                 | 0,1   | 0,89                 | 0,05  |
| CD44                     | 79,6                 | 83,25 | 86,1                 | 89,6  |
| CD25                     | 0,24                 | 0,14  | 0,43                 | 0,08  |
| CD13                     | 35,7                 | 14,18 | 49,1                 | 41,57 |
| CD38                     | 0,93                 | 0,25  | 0,81                 | 0,07  |
| Ki-67                    | 1,2                  | –     | 2,2                  | –     |
| CD106                    | 0,87                 | 0,29  | 0,72                 | 0,26  |

В обоих случаях при культивировании с животной сывороткой или без клетки имели поверхностные маркеры, характерные для МСК: CD44, CD73, CD105 и др. Контаминация гемопоэтическими клетками была менее выражена при экспансии в бессывороточной среде, как на ранних, так и на поздних пассажах (данные не достоверны).

В нашем исследовании была изучена возможность культивирования МСК на различных средах. Ограничением настоящего исследования является небольшое количество образцов, которое не позволило получить статистически значимого различия в числе полученных при культивировании клеток. Тем не менее была отмечена тенденция к меньшему числу прироста МСК при культивировании их на средах, не содержащих животной сыворотки. Вместе с тем, как следует из приведенного выше международного опыта, бессывороточные среды могут быть использованы для культивирования МСК и получения адекватного количества клеток, достаточного для применения в клинической практике.

Необходимо проведение дальнейших исследований, которые позволят определить место бессывороточных сред в протоколах *ex vivo* экспансии МСК, в том числе и для клинического применения.

# Л и т е р а т у р а

1. Caterson E.J., Nesti L.J., Danielson K.J., Tuan R.S. Human marrow derived mesenchymal progenitor cells: Isolation culture, expansion and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 2002;20:245–56.
2. Draper J.S., Moore H.D., Ruban N.N. et al. Culture and characterisation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:325–36.
3. Muller I., Kordowich S., Holzwarth C. et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8(5):437–44.
4. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
5. Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 2006;81:1390–7.
6. Berger M.G., Veyrat-Masson R., Rapatel C. et al. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 2006;24:2888–90.
7. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Salagianni M. et al. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 2006;24(5):1409–10.
8. Le Blanc K., Frassoni F., Ball L. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579–86.
9. Horwitz E.M., Gordon P.L., Fitzpatrick L.A. Transplantability and therapeutic effects of bone-marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–13.
10. Bernardo M.E., Avanzini M.A., Perotti C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: Further insight in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007;211:121–30.
11. Shahdadfar A., Fronsdal K., Haug T. et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005;23:1357–66.
12. Doucet C., Emou I., Zhang Y. et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005;205:228–36.
13. Camargo P.M., Lecovic V., Weinaender M. et al. Platelet-rich plasma and bovine porous mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol Res* 2002;37(4):300–6.
14. Dugrillon A., Eichler H., Kern S., Klütter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31(6):615–9.
15. Tözüm T.F., Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003;69(10):664.
16. Eppley B.L., Woodell J.E., Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1502–8.
17. Zimmermann R., Arnold D., Strasser E. et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang* 2003;85:283–9.
18. Zimmermann R., Jakubietz R., Jakubietz M. et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;41:1217–24.
19. Borzini P., Mazzucco L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome/heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005;45:1759–67.
20. Everts P.A., Hoffmann J., Weibrich G. et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med* 2006;16:363–8.
21. Reinisch A., Bartmann C., Rohde E. et al. Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical applications. *Regen Med* 2007;2:371–82.
22. Lange C., Cakiroglu F., Spiess A.-N. et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213:18–26.
23. Carrancio S., Lopez-Holgado N., Sanchez-Guijo F.M. et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 2008;36(8):1014–21.
24. Stute N., Holtz K., Bubenheim M. et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 2004;32:1212–25.
25. Kobayashi T., Watanabe H., Yanagawa T. et al. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:1426–33.
26. Shigeno Y., Ashton B.A. Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77:139–42.
27. Anselme K., Broux O., Noel B. et al. In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2002;8:941–53.
28. Yamamoto N., Isobe M., Negishi A. et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci* 2003;50:63–9.
29. Spees J.L., Gregory C.A., Singh H. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinnogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 2004;9:747–56.
30. Koller M.R., Maher R.J., Manchel I. et al. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother* 1998;7:413–23.
31. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Robey P.G. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 2000;70:1780–7.
32. Yamaguchi M., Hirayama F., Wakamoto S. et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. *Transfusion* 2002;42:921–7.
33. Orefio R.O., Virdi A.S., Triffitt J.T. Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur J Cell Biol* 1997;74:251–61.
34. Gregory C.A., Reyes E., Whitney M.J. et al. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogeneic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem cells* 2006;24:2232–43.
35. Lam A.C., Li K., Zang Z.B. et al. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion* 2001;41:1567.
36. Shetty P., Bharucha K., Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biology International* 2007;31:293–8.
37. Gronthos S., Simmons P.J. The growth factor requirements of STRO-1- positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. *Blood* 1995;85:929–40.
38. Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol* 1997;97:561–70.
39. Foreman M.A., Smith J., Publicover S.J. Characterisation of serum-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in primary bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2006;206(3):664–71.
40. Lennom D.P., Haynesworth S.E., Young R.G. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. *Exp Cell Res* 1995;219:211–22.
41. Meuleman N., Tondreau T., Delforge A. et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical  $\alpha$ -MEM medium. *Eur J Haematol* 2006;76:309–16.
42. Tonti G.A., Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol* 2008;52(8):1023–32.