

**ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава
России**

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗИНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА КИНЕТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ**

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) взрослого человека имеют высокую пролиферативную активность и способны дифференцироваться в различные клеточные линии, что представляет особую ценность для регенеративной медицины [1]. Активное изучение данных клеток продолжается на протяжении нескольких десятилетий, однако до сих пор остаётся множество нерешённых вопросов их культивирования *in vitro*. Рост клеточной культуры, пролиферативная активность и дифференцировочный потенциал зависят от множества факторов, таких как количество и состав питательной среды, плотность пассажа, свойств культурального пластика [2, 3]. С учётом большого терапевтического потенциала МСК возникает потребность в более детальном изучении факторов, влияющих на рост клеточной культуры.

Целью настоящего исследования являлось оценка кинетических характеристик популяции МСК жировой ткани человека в зависимости от количества внесённых клеток и объёма добавленной питательной среды.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы проводилась в научной лаборатории на базе кафедры биохимии Тверского ГМУ. Выделение МСК производили по методике Zuket. al.[4] из подкожного жира пациента с варикозной болезнью с соблюдением биоэтических норм. При ламинарном токе воздуха образцы ткани измельчали ножницами и инкубировали с коллагеназой I типа при 37°C в течение 60 минут при постоянном встряхивании. После инактивации фермента эквивалентным объемом среды ДМЕМ, содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки, клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали и пропускали через нейлоновый фильтр. Клетки инкубировали в среде роста при 37°C в атмосфере 5 % CO₂. На следующий день для удаления неприкрепившихся клеток питательную среду заменяли свежей. В дальнейшем эту процедуру повторяли каждые 2-3 сут. При достижении субконфлюентного состояния клетки снимали трипсином-ЭДТА и пересевали в новые чашки. В работе использовали клетки 4 пассажа.

В ходе основного эксперимента в ячейки 24-луночного планшета вносили суспензию МСК из расчета 800, 1600, 2400 или 3200 кл./лунку. Объем свежей питательной среды составлял 0,25 или 1 мл среды на 1 см² поверхности, что соответствовало толщине питающего слоя 0,125 и 0,5 мм. Культивирование продолжалось в течении 4 сут., после чего клетки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Оценку кинетических характеристик МСК проводили с помощью программы *ImageView* при анализе фотографий случайно выбранных полей зрения, полученных с использованием светового инвертированного микроскопа (Микромед). Подсчитывали среднюю плотность клеток в зависимости от количества внесённой среды и биологического материала, относительный прирост биомассы, а также скорость роста клеток. Относительный прирост биомассы рассчитывали по формуле:

$$\text{Относительный прирост биомассы} = \frac{N - N_0}{N_0}$$

где N_0 — количество клеток в начальный момент времени, N — количество клеток в конечный момент времени. Среднюю скорость роста за время культивирования определяли по формуле:

$$\text{Средняя скорость роста} = \frac{N - N_0}{t}$$

где t — время культивирования, сут.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «MS Excel» и «Statistica». В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего, объем выборки. Достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Интенсивность роста культуры МСК определяется исходным количеством клеток (N₀). Соответствующие зависимости для плотности клеток (рисунок 1А) и средней скорости роста культуры (рисунок 1В) имели вид кривых насыщения. Их линейаризация в двойных обратных координатах позволила рассчитать предельные значения данных параметров. В условиях эксперимента максимальная возможная плотность клеток составила 30 тыс. кл./см², что соответствует площади, занимаемой одиночной клеткой на поверхности субстрата, примерно равной 3000 мкм². Предельное значение средней скорости роста составляло 10 тыс. кл./сут. Показательно, что величина относительного прироста биомассы, напротив, убывала с увеличением исходного количества клеток (рис. 1 Б). Наибольшая продуктивность биомассы наблюдалась при N₀ в диапазоне 1-1,5 тыс. кл. на лунку, когда еще не сильно проявлялся эффект контактного торможения.

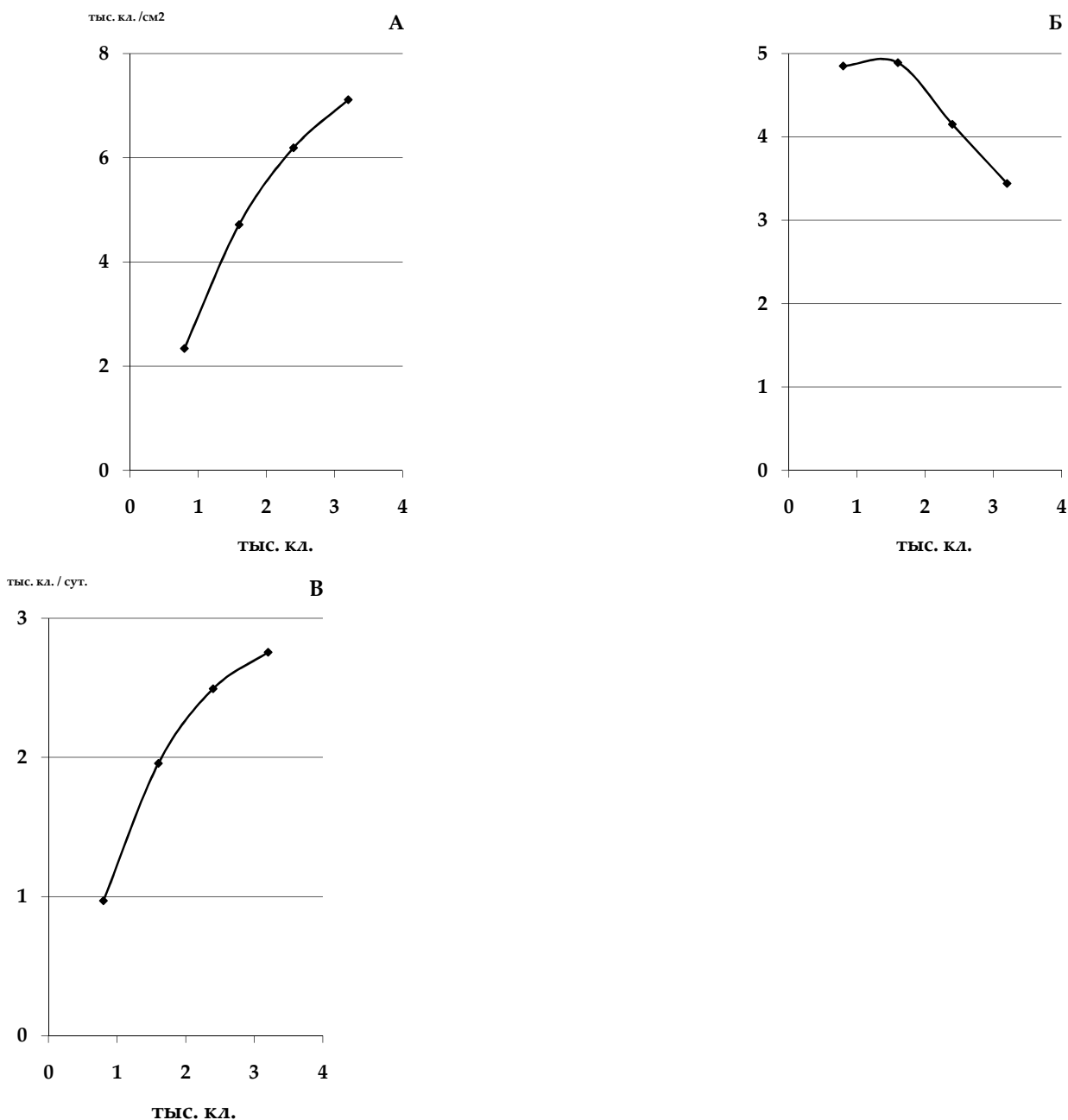


Рисунок 1. Кинетические характеристики культур МСК в зависимости от количества внесённых клеток (n=20): А — плотность клеток, Б — относительный прирост биомассы, В — средняя скорость роста

В ходе второй серии эксперимента было установлено, что на рост клеточной культуры также влияет количество вносимой питательной среды (рисунок 2). При увеличении толщины питающего слоя от 0,125 до 0,5 мм значения всех кинетических показателей возрастали на 15-25 %. Различия были тем более значимыми, чем больше вносилось исходных клеток.

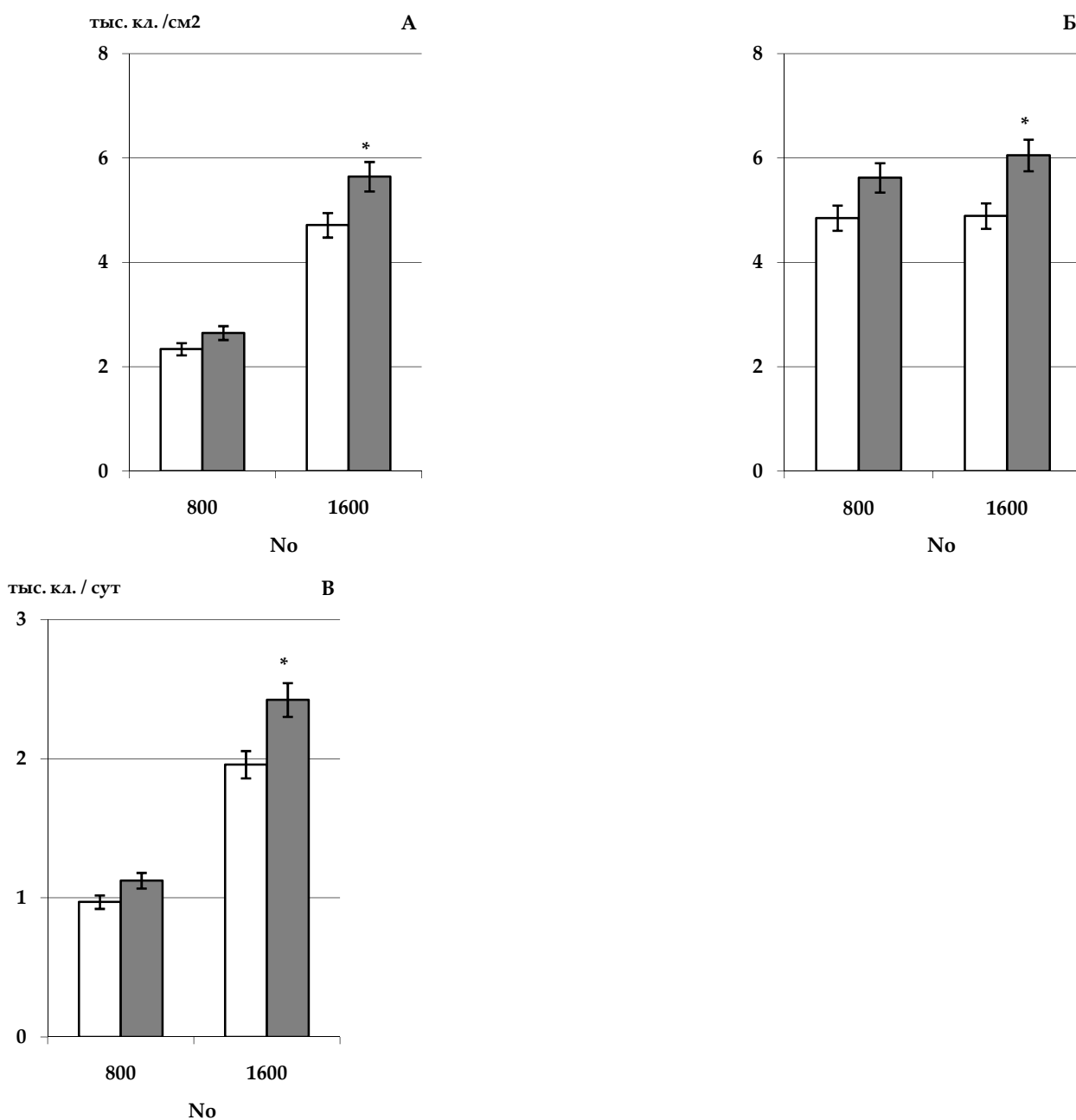


Рисунок 2. Кинетические характеристики культур МСК в зависимости от количества добавленной питательной среды ($M \pm m$, $n=20$):

А — плотность клеток, Б — относительный прирост биомассы, В — средняя скорость роста;

светлые столбцы — толщина слоя питательной среды 0,125 мм, темные столбцы — толщина слоя питательной среды 0,5 мм;

* — статистически значимо по сравнению с параллельным экспериментом ($p < 0,05$)

Заключение: интенсивность роста культур мезенхимальных стромальных клеток человека имеет нелинейную зависимость от количества исходно вносимых клеток и объема питательной среды, что следует учитывать при разработке протоколов ведения культуры.

Литература

1. Калинина Н. И., Сысоева В. Ю., Рубина К. А., Парфенова Е. В., Ткачук В. А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей //

- ActaNaturae (русскоязычная версия). — 2011. — №4. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/mezenhimalnye-stvolovye-kletki-v-protsessah-rosta-i-reparatsii-tkaney> (дата обращения: 25.12.2015).
2. Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г. и др. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании // Журн. АМН України. — 2008. — Т. 14, №2. — С. 354–365.
 3. Черноруцкий М.В. Кинетические и морфологические особенности роста мезенхимальных стромальных клеток человека на культуральном пластике разных производителей // Материалы VIII Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум» URL: <http://www.scienceforum.ru/2016/2/18227> (дата обращения: 8.02.2016).
 4. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell. — 2002. — V. 13. — P. 4279–4295.