

УДК 576.3:576.53

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЛОШАДИ В БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

© 2024 г. И. П. Савченкова*

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва, 109428, Россия

* E-mail: s-ip@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024

После доработки 16.04.2024

Принята к публикации 17.04.2024

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани (ЖТ) лошадей, представляют собой перспективный материал для создания биоветеринарных продуктов с целью профилактики и лечения многих заболеваний. Производство этих клеток для клинического применения требует совершенствования условий бессывороточного культивирования. Микроокружение может оказывать влияние на свойства МСК. Считается, что требования к условиям культивирования без сыворотки крови животных являются видоспецифичными. Целью настоящего исследования было оценить коммерчески доступную бессывороточную среду (БС) MesenCult (STEMCELL Technologies, США), созданную для МСК человека, для культивирования МСК(ЖТ) лошади. Одну часть клеток размножали в течение 10 пассажей в стандартной среде ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л) и 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК), а вторую – в БС. Результаты показывают, что размножение МСК лошади в БС (MesenCult), предназначенной для культивирования МСК человека, возможно, так как клетки хорошо к ней адаптируются и сохраняют свойства, характерные для клеток, которые культивируются в ДМЕМ с СКПК: морфологию, скорость роста, время удвоения и митотический индекс, клонообразующие способности, диплоидный набор хромосом, большое количество клеток с фенотипом CD90 (90.8%) и низкое с фенотипом CD31 (0.8%), CD34 (0.9%), а также потенции при индукции к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях. МСК(ЖТ) лошади демонстрировали стабильные характеристики после культивирования в течение 10 пассажей в БС, что обеспечивает многообещающую основу для их дальнейшего использования. Наши результаты демонстрируют, что среда MesenCult может быть альтернативой для бессывороточного культивирования МСК(ЖТ) лошади с целью их размножения в предклинических исследованиях.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые/стромальные клетки, лошадь, жировая ткань, культивирование, бессывороточная среда MesenCult

Принятые сокращения: БС – бессывороточная среда; КМ – костный мозг; ЖТ – жировая ткань; МСК – мезенхимные стволовые/стромальные клетки; ПК – пуповинная кровь; СКПК – сыворотка крови плодов коров.

DOI: 10.31857/S0041377124040043 **EDN:** QCYGHE

Клетки, выделенные из разных источников тканей, таких как костный мозг (КМ), жировая ткань (ЖТ), пуповинная кровь (ПК), плацента, дентин пульпы зуба, дерма кожи, с фенотипом мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) у разных видов животных, в том числе и человека, демонстрируют схожие свойства при адаптации их к условиям культивирования. Это вытянутые веретенообразные клетки с фибробластоподобной морфологией, с круглым или овальным ядром, в котором хорошо

визуализируются 2–4 ядрышка. Они обладают высокой адгезивной способностью, быстро прикрепляются ко дну культурального флакона, размножаются, образуя монослой, имеют клонообразующие способности и сохраняют во время длительного культивирования геномную стабильность при самообновлении (более 50–55 цитогенераций). До сих пор не найден специфический маркер (ген), экспрессия которого бы на транскрипционном или трансляционном уровнях, подтверждала их происхождение.

Поэтому эти клетки оцениваются по транскриптому (комплексу мРНК) и/или иммунофенотипу (комплексу CD-маркеров), который характеризуется наличием поверхностных антигенов CD73, CD90, CD105 и отсутствием CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a или CD19 или антигенов комплекса гистосовместимости класса II (HLA II, лейкоцитарные антигены класса II человека). Основным критерием принадлежности клеток к популяции МСК остается функциональный тест *in vitro* – способность при индукции к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях. Эти клетки должны обладать прогениторными свойствами – дифференцироваться во все типы клеток костной, хрящевой и жировой тканей (Dominici et al., 2006; Bianco et al., 2008; Andrzejska et al., 2019).

В последние годы МСК исследуются на предмет их потенциального клинического применения при различных заболеваниях, включая ортопедические травмы и воспалительные/иммуноопосредованные заболевания (Jones, McTaggart, 2008; Menard et al., 2020; Watanabe et al., 2021; Паюшина и др., 2022). Учитывая иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства, Каплан (Caplan, 2017) предложил называть их медицинскими сигнальными клетками (medicinal signaling cells). Для лечения широкого спектра заболеваний разрабатываются клеточные, на основе МСК, (Wang et al., 2016) и неклеточные (кондиционированная среда, экзосомы) продукты (Huang, Lai, 2019; Nan et al., 2022). Число клинических исследований, успешно завершивших фазу II и вошедших в фазу III, растет с каждым годом (Moll et al., 2019; Viswanathan et al., 2021). Чтобы получить терапевтически значимое количество МСК, необходимо адаптировать их к условиям *in vitro* и размножить. Микроокружение может оказать огромное влияние на свойства клеток. Стандартные условия их культивирования требуют наличия среды ДМЕМ с низким содержанием глюкозы (1 г/л), которую дополняют 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК или FBS в англоязычной литературе) (Zuk et al., 2002; Тепляшин и др., 2005).

Ростовые среды на основе СКПК представляют потенциальную угрозу заражения клеток патогенами, такими как микоплазмы,

вирусы и прионы; последние из перечисленных могут быть источником распространения трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Сыворотка крови животных – самый нестабильный компонент питательной среды вследствие ее изменчивости от партии к партии (сохраняются проблемы, касающиеся ее сбора), а также ожидаемой нехватки в будущем, когда клеточная терапия будет использоваться более интенсивно. В качестве замены СКПК в среде для культивирования МСК человека, рассматривается лизат тромбоцитов (Gottipamula et al., 2013). Продемонстрировано, что добавление его в среду увеличивает пролиферацию МСК человека по сравнению со средой, которая содержит СКПК, и не влияет на экспрессию генов поверхностных антигенов клеток (Jung et al., 2012; Kinzebach, Bieback, 2013), кроме HLA-DR (Dam et al., 2021). С точки зрения варибельности состава лизата тромбоцитов от партии к партии, возможного загрязнения патогенами, а также вероятности нехватки поставок в будущем, эта добавка имеет те же недостатки, что и сыворотка крови животных. Многие работники по-прежнему выращивают МСК в среде с добавлением СКПК. Международное общество клеточной терапии (ISCT) недавно обратилось к этому вопросу, стремясь к достижению соглашения по поводу заменителей сыворотки и бессывороточных сред (БС) для клеточной терапии (Karnieli et al., 2017).

Поиск условий культивирования, свободных от ксенобелков, для снижения вероятности возникновения иммунных реакций на чужеродные белки и передачи инфекционных заболеваний, позволил разработать для МСК человека подходящее микроокружение без сыворотки крови животных (Gottipamula et al., 2013; Bhat et al., 2021). Эти среды, например, StemPro[®]MSC SFM XenoFree (Thermo FS, США), StemMACS[™] MSC Expansion Media Kit XF (Miltenyi Biotec, Германия), CellCor[™]CD^{MSC} (XCELL, Республика Корея) и другие содержат очищенные или рекомбинантные белки и синтетические пептиды. БС были разработаны для размножения МСК человека и изучены в такой же степени, как и среды на основе лизата тромбоцитов. Было продемонстрировано, что МСК человека пролиферируют в таких условиях и сохраняют способность к дифференцировке

при индукции, однако имеются также сообщения об индуцированном старении клеток *in vitro* (Lee et al., 2022). Анализ данных, приведенных в вышеперечисленных источниках научной литературы по использованию БС для МСК человека, носят противоречивый характер. БС могут отличаться от партии к партии, их состав недоступен исследователям, что усложняет поиск наиболее подходящей среды для размножения МСК с целью создания клеточного продукта и их клинического применения. В соответствии с рекомендациями, опубликованными ISCT (Karnieli et al., 2017), крайне важно оценить влияние конкретных условий бессывороточного культивирования на конкретный тип МСК, предназначенных для клеточной терапии. В идеале переход на БС должен быть осуществлен на ранней стадии таких исследований, чтобы можно было изучить эффективность и механизм ее действия.

Опубликованные исследования по пригодности БС в основном сосредоточены на культивировании МСК(КМ) и МСК(ЖТ) человека. Бессывороточная культура МСК крупных животных рассматривалась лишь в очень небольшом количестве исследований (Naskou et al., 2018; Hagen et al., 2022; Pilgrim et al., 2022). Аутологичные модели животных часто используются при трансляционной разработке терапии МСК для медицины человека, при этом было бы желательно работать с МСК, культивируемыми в сравнимых условиях культивирования, которые предназначены для оценки конечного клеточного продукта. Более того, клеточная терапия разрабатывается не только для медицины, но и для ветеринарии, что требует адекватных производственных процессов и одобрения регулирующих органов (Borjesson, Pegoni, 2011). Поскольку клеточные продукты на основе МСК все чаще используются для лечения собак и лошадей (Victorova, Savchenkova, 2020; Platonova et al., 2021), производство этих клеток для клинического применения требует совершенствования систем культивирования для удовлетворения потребностей в их большом количестве и удалении ксенобелков.

Следует отметить, что в настоящее время имеется недостаточно данных по созданию БС для поддержания МСК животных. У лошадей МСК выделяют из разных источников тканей (Vidal et al., 2012; Коровина и др., 2015). Их

функциональные свойства в значительной степени охарактеризованы (Коровина и др., 2017; de Schauwer et al., 2011), и накапливаются данные об успешном применении их в клеточной терапии лечения ортопедических заболеваний лошадей (Govoni, 2015; Jammes et al., 2023, Petrova, Vachkova 2023). В связи с этим поведение МСК лошадей в бессывороточных условиях культивирования представляет интерес.

Цель данного исследования заключалась в оценке коммерчески доступной БС MesenCult (STEMCELL Technologies, США) для культивирования МСК(ЖТ) лошадей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и их культивирование. В работе использовали клетки с фенотипом, подобным МСК, полученные из ЖТ здоровых лошадей в возрасте 5 ± 2.5 лет, которые были охарактеризованы, заморожены на 2–3 пассажах культивирования и хранились в криобанке Лаборатории стволовых клеток ФНЦ Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии РАН (Москва). Одну ампулу клеток размораживали в один культуральный флакон с площадью роста 25 см^2 и после образования клеточного монослоя пересевали в два одинаковых флакона в соотношении 1:2 (0-й пассаж). Клетки 1-го флакона культивировали в обычных условиях (контроль), т. е. в среде Игла в модификации Дюльбекко (DMEM; “ПанЭко”, Россия), которая содержала 1 г/л глюкозы, 10% СКПК (INTL KANG, Китай) и однократный раствор заменимых аминокислот (Gibco, Invitrogene, Life Technologies, США) без антибиотиков. Клетки 2-го флакона культивировали в БС MesenCult human (STEMCELL Technologies, США), как рекомендовано производителем. Среда MesenCult представляет собой стандартизованную базальную среду, в которую вносят дополнительно добавку MesenCult, стимулирующую размножение МСК человека *in vitro*.

Для культивирования клеток использовали стандартные культуральные флаконы с площадью посева 25 см^2 (SPL, Корея). Клетки пассировали в соотношении 1:5. Плотность клеток при пассировании составляла $5 \cdot 10^3$ клеток на 1 см^2 . Для отделения клеток от дна флакона при пассировании их обрабатывали

0.4%-ным раствором Версена (“ПанЭко”, Россия), а затем 0.25%-ным раствором трипсина (“ПанЭко”, Россия). Культивирование проводили в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере, меняя среду два раза в неделю. Клетки культивировали до 10-го пассажа включительно.

Оценка свойств МСК(ЖТ) в культуре. МСК оценивали по морфологии, адгезии ко дну культурального пластика, скорости и качеству формируемого клеточного монослоя, способности клеток к размножению.

Морфологический анализ клеток, растущих в разных средах, проводили на 4-е сут после посева, на 4-м и 10-м пассажах в окрашенных препаратах (краситель “Гимза”, “ПанЭко”, Россия) визуалью с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8. (<http://www.zeiss.com>)

Скорость формирования монослоя клеточных популяций, посеянных в одной и той же концентрации, оценивали по динамике изменения количества клеток, вплоть до момента образования ими 100%-ного монослоя.

Продолжительность клеточного цикла в исследуемых МСК определяли на основании данных о времени удвоения числа клеток. Долю клеток в фазе G₀ не учитывали. Среднее время удвоения числа клеток рассчитывали по формуле $t_d = t / \log_2(N_t / N_0)$, где t_d – время удвоения числа клеток, t – время между начальным и конечным подсчетом клеток, N_0 и N_t – число клеток в начале и конце эксперимента соответственно.

Митотический индекс для каждой популяции клеток рассчитывали в фазе логарифмического роста как отношение числа митозов к общему числу подсчитанных клеток, умноженное на 1000 (в ‰).

Способность клонообразования анализировали на 10-м пассаже культивирования клеток в разных средах. Для этого МСК пассировали при плотности $1 \cdot 10^3$ в культуральные флаконы (25 см²). Эффективность клонообразования рассчитывали в процентах, как отношение числа сформированных клонов к общему числу посеянных клеток.

Кариотипический анализ МСК(ЖТ) лошади. Митоз МСК в логарифмической фазе роста блокировали 100-кратным раствором колхицина

(“Биолог”, Россия) в конечной концентрации 0.1 мкг/мл в течение 4 ч. Клетки снимали с субстрата как описано выше, осаждали высокоскоростным центрифугированием (500 g, 10 мин), затем проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 М раствора KCl и 1%-ного раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали (трижды) смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1) с последовательным их осаждением высокоскоростным центрифугированием (500 g, 10 мин). Клетки раскапывали на предметное стекло и окрашивали 1%-ным раствором Гимза для количественного кариотипического анализа. Для каждой группы МСК(ЖТ) лошади на 10-м пассаже оценивали не менее 20 метафазных пластинок.

Иммуноцитохимический анализ. Наличие поверхностных антигенов (АГ) на МСК(ЖТ) анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics Elite Coulter (США). Для этого клетки на 10-м пассаже после культивирования в разных средах (стандартная и БС) снимали с субстрата 0.25%-ным раствором трипсина, считали, отмывали и аликвоты по $2 \cdot 10^5$ клеток инкубировали с мышинными антителами против антигенов человека: CD31, CD34, CD90 (Becton Dickinson, США), в разведении 1:30 (PBS, дополненный 2% СКПК) при 4°C в течение 45 мин в темноте. В качестве вторых использовали анти-мышинные IgG, меченые FITC той же фирмы. Присутствие каждого антигена оценивали по результатам трех экспериментов.

Индукция адипо-, остео- и хондрогенной дифференцировок МСК(ЖТ). Способность МСК к дифференцировке в трех направлениях *in vitro* изучали с использованием наборов для дифференцировки StemPro® (Gibco by Life Technologies, США). Клетки на 4-м и 10-м пассажах переносили в 24-луночные планшеты при плотности $1 \cdot 10^4$ кл./см². По достижении 70–80%-ного монослоя питательную среду удаляли и добавляли соответствующую индукционную, которую меняли каждые 3–4 сут. Эффективность дифференцировки оценивали на 21 сут культивирования. Клетки фиксировали метанолом, охлажденным до –20°C (Mason Fine Chemicals, США) в течение 30 мин, и окрашивали специфическими красителями. Липидные включения в цитоплазме клеток при адипогенной дифференцировке выявляли

визуально под микроскопом. Эффективность остеогенной дифференцировки анализировали по окраске карбонатов и фосфатов кальция методом серебрения по Ван Косса с помощью набора (Bio-Optica, Италия). Дифференцировку в хондрогенном направлении в монослой выявляли окрашиванием полисахаридов и муцинов альциановым синим (“БиоВитрум”, Россия), в сочетании с гематоксилином Гарриса (“Лаб-поинт”, Россия).

Статистический анализ. Все эксперименты повторяли трижды. Полученные результаты представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений. Статистические сравнения между экспериментальными группами проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности $P < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Морфологические различия между МСК(ЖТ) лошади на 4-е сут после посева в разные экспериментальные группы (стандартные условия культивирования (DMEM с 10% СКПК) и БС MesenCult для МСК человека) не были обнаружены. Клеточные популяции представлены узкими веретенообразными клетками с фибробластоподобной морфологией (рис. 1а, б), которые имели овальное или круглое ядро, расположенное в центре, с 2–4 ядрышками и однородную незернистую цитоплазму. В условиях короткого (4 пассажа) и более длительного культивирования (10 пассажей) в клеточной популяции, находящейся в БС, изменений морфологии клеток не наблюдали (рис. 1г, е) по сравнению с контрольной группой (рис. 1в, д) соответственно.

Ростовые характеристики. В стандартных условиях культивирования на ранних пассажах среднее время удвоения популяции МСК(ЖТ) лошади составляло 46 ± 0.01 ч, митотический индекс — 34%, а в среде MesenCult эти показатели составляли 48 ± 0.03 и 33% соответственно. К 10-му пассажу эти показатели менялись незначительно. Так, время удвоения в стандартных условиях было 48 ± 0.07 с митотическим индексом 33%, а в среде БС 46 ± 0.01 и 33% соответственно. По скорости роста МСК в двух экспериментальных группах не

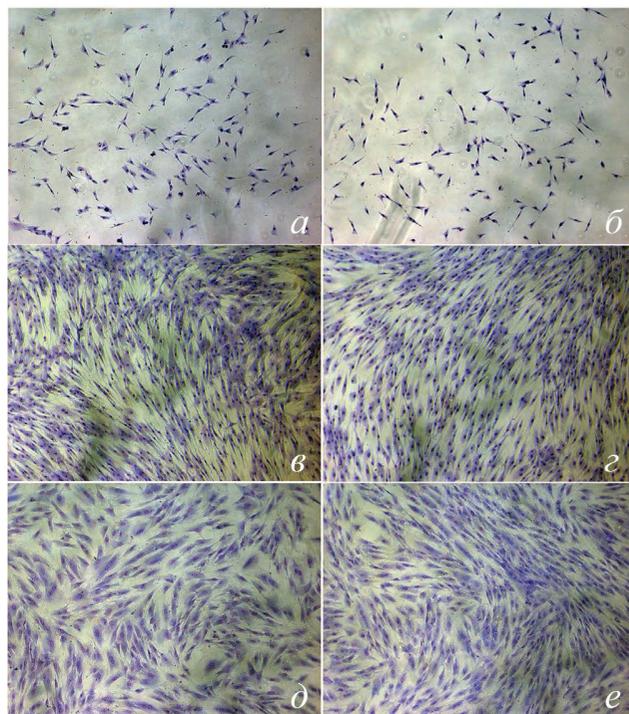


Рис. 1. Морфология МСК(ЖТ) лошади, культивируемых в обычной среде (а, в, д) и БС MesenCult (б, з, е) на 4-е сут после посева (а, б) и на пассажах 4 (в, з) и 10 (д, е). Увел: об. 10×, ок. 10×.

различалась между собой ни в одном временном интервале их размножения ($P \leq 0.01$). При посеве клеток в плотности $2 \cdot 10^3$ на cm^2 они формировали 100%-ный монослой в обеих группах через 8 ± 0.001 сут культивирования.

Одной из характеристик МСК животных является способность их при низкой плотности посева образовывать клоны. Результаты наших исследований показали, что эффективность клонирования МСК(ЖТ) не зависела от способа их культивирования в среде DMEM с СКПК или в среде MesenCult и составляла $89 \pm 0.1\%$ и $87 \pm 0.01\%$ соответственно.

Кариотипический анализ. В табл. 1 представлены результаты кариотипического анализа, выполненные на 4-м и 10-м пассажах культивирования МСК в стандартных условиях (контроль) и БС MesenCult соответственно. Количественный анализ хромосом показал, что МСК(ЖТ) лошади, культивируемые в среде с сывороткой крови и без нее, сохраняли диплоидный набор хромосом. Анеуплоидия, полиплоидия и случайные потери числа хромосом не были обнаружены.

Таблица 1. Кариотипический анализ МСК(ЖТ) лошади на ранних и поздних пассажах культивирования в разных условиях

Среда культивирования	№ пассажа	Метафазные пластинки (число)	Метафазы/число клеток	Анеуплоидия (%)	Полипloidия, %	Случайные потери (число хромосом)	Кариотип (число хромосом, %)
DMEM + +10% СКПК	4	20	34/1000	0	0	0	64, XX (100)
	10	29	33/1000	0	0	0	64, XX (100)
BC MesenCult	4	21	33/1000	0	0	0	64, XX (100)
	10	20	36/1200	0	0	0	64, XX (100)

Иммунофенотипирование. При связывании с соответствующими мечеными антителами МСК лошади окрашиваются на CD44, CD90, CD105 и не окрашиваются на CD31, CD34 и CD45. Ранее мы показали, что мышинные антитела против антигенов человека обладают специфичностью при выявлении экспрессии генов некоторых поверхностных антигенов (CD31, CD34, CD90) на МСК, выделенных из пуповинной крови (ПК) лошади (Коровина и др., 2017). Мы использовали мышинные антитела против антигенов человека, основываясь на результатах работы, в которой было проанализировано 379 мышинных антител против кластера молекул дифференцировки человека на межвидовую кросс-реактивность с лейкоцитами лошади и показана возможность их использования (Ibrahim et al., 2007). В связи с этим, не имея специфичных антител против антигенов лошади, мы окрашивали МСК(ЖТ), культивируемые в разных условиях на 10-м пассаже, антителами против тех же антигенов, что и МСК(ПК) лошади.

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, МСК(ЖТ) лошади не окрашивались на CD34 (сиаломуцин) и CD31 (PECAM), которые выявляются на поверхности гемопоэтических стволовых и эндотелиальных клеток соответственно. Количество клеток с фенотипом CD90⁺ в условиях бессывороточного культивирования было сопоставимо с контролем и не менялось. Результаты показывают, что статистически значимых различий экспрессии одного из маркеров фенотипа МСК (CD90) не обнаружено ($P \leq 0.01$). Ранее другими авторами (Shubert et al., 2018) было показано, что при культивировании МСК лошадей в BC (среде MACX) на 3-м

пассаже доля клеток положительно окрашенных на CD29 и CD90 варьировала от 60.3 до 99.3% и от 5.21 до 36.7% соответственно. Клетки, культивируемые в DMEM, показали более стабильную популяцию с фенотипом CD90⁺ (86.2–99.5%).

Прогениторные свойства МСК(ЖТ) лошади. Из-за отсутствия панели специфичных антител против антигенов лошади в настоящих экспериментах оценивали влияние условий культивирования в присутствии и отсутствии СКПК на функциональные свойства МСК, а именно формировать при индукции клетки жировой, костной и хрящевой тканей. На 21-е сут культивирования МСК в среде, содержащей индукторы, которые направляют дифференцировку в направлении жировой ткани, наблюдали формирование адипоцитов с липидными везикулами как в клетках, культивируемых в стандартных условиях, так и в BC MesenCult (рис. 3а, б). При индукции МСК(ЖТ) в остеогенном направлении на 21-е сут окраска методом серебрения по Косса выявила наличие солей кальция в межклеточном пространстве в обеих группах, которые окрашивались в черный цвет (рис. 3в, г), а при индукции в хондрогенном направлении в это же время отмечали формирование клеточных пучков, которые окрашивались альциановым синим в синий цвет (рис. 3д, е). Таким образом, МСК(ЖТ) лошади *in vitro* сохраняли свои прогениторные свойства при индукции к дифференцировке независимо от способа их культивирования в течение 10 пассажей.

Результаты наших экспериментов показали, что МСК(ЖТ) лошади могут быть размножены в коммерчески доступной среде

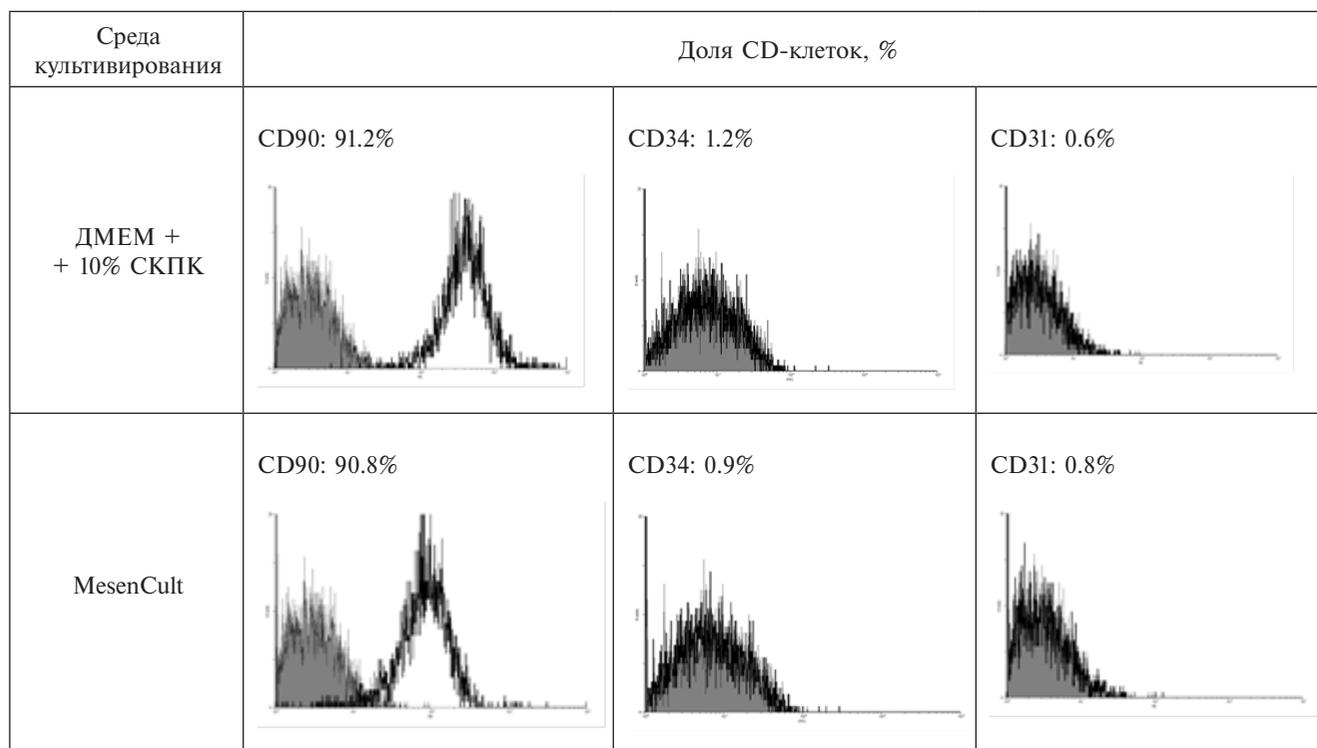


Рис. 2. Гистограммы проточной цитометрии с использованием специфических антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD31, CD34, CD90. Серым цветом выделены гистограммы, соответствующие контрольному окрашиванию клеток IgG, меченными FITC; белым – гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, меченными FITC.

MesenCult, не содержащей СКПК, которая предназначена для культивирования МСК человека (www.stemcell.com). МСК сохраняли единообразную морфологию, характерную для этого типа клеток, на протяжении 10 пассажей и экспрессию гена поверхностного антигена CD90, сопоставимую с контрольной группой ($P \leq 0.01$), а также при индукции были способны к дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях.

В настоящее время сообщений о результатах, демонстрирующих возможность использования такой среды для поддержания клеток с фенотипом МСК других видов животных недостаточно. Высказывается предположение, что требования к условиям культивирования в БС являются видоспецифичными (Schubert et al., 2018). Это указывает на необходимость оптимизации БС для МСК соответствующих видов животных. Так, имеются данные о поддержании без ксенобелков МСК(ЖТ) собак и лошадей, которые не теряют свои прогениторные свойства (Clark et al., 2016). Однако удаление СКПК из систем культивирования МСК собак и лошадей

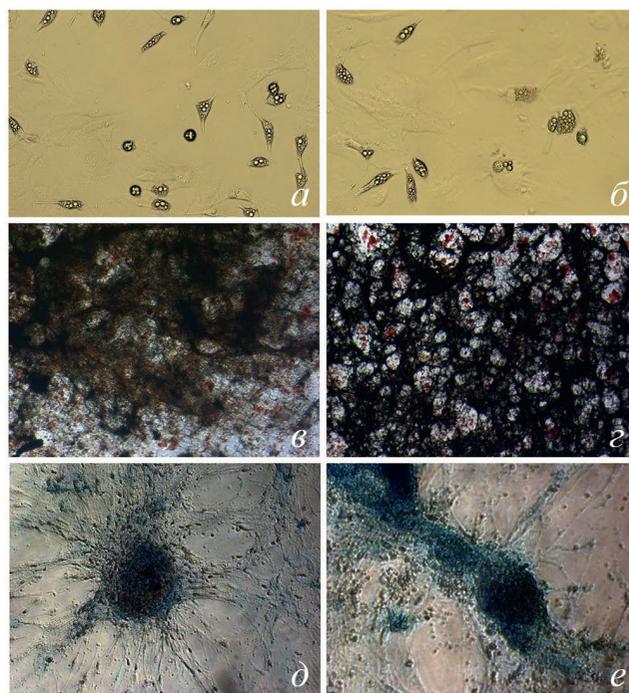


Рис. 3. Способность МСК(ЖТ) лошади формировать клетки жировой (а, б), костной (в, з) и хрящевой (д, е) тканей при индукции к дифференцировке после культивирования в течение 10 пассажей в стандартной среде и БС. Увел.: об. 20×, ок. 10×.

привело к снижению пролиферации этих клеток и изменению их иммуномодулирующих свойств *in vitro*. МСК лошади секретируют значительно меньше простагландина 2 (PGE₂) и утрачивали способность ингибировать секрецию интерферона γ (IFN γ) активированными Т-лимфоцитами, в то время как у МСК(ЖТ) собак такого влияния не выявлено (Clark et al., 2016). Требуется дополнительные исследования для перехода к условиям размножения МСК животных в БС. Следует отметить, что в большинстве исследований на МСК животных, включая человека, не всегда проводился анализ влияния той или иной БС на экспрессию генов поверхностных антигенов, подтверждающих иммунофенотип МСК. Прогениторные свойства МСК после бессывороточного культивирования также оценивали в разной степени и эти данные тоже носят противоречивый характер (Lee et al., 2022; Chen et al., 2023).

В связи с этим предпринимаются попытки с помощью подбора комбинаций факторов роста разработать свою БС, способную поддерживать пролиферацию и клонообразующую способность МСК определенного вида *in vitro*. В результате такого подбора была создана БС, пригодная для культивирования МСК(ЖТ) собак (Devireddy et al., 2019), в которой характеристики роста клеток были сопоставимы с характеристиками, полученными в стандартной среде ДМЕМ, содержащей 10% СКПК. Кроме того, наличие поверхностных белков на клеточной поверхности и прогениторный потенциал МСК(ЖТ) собак в БС и в стандартных условиях также были схожими. Однако коммерческая БС, разработанная для культивирования МСК человека, не способствовала росту МСК(ЖТ) собак. В этой работе (Devireddy et al., 2019), продемонстрировано, что требования к факторам роста для выделения и размножения МСК(ЖТ) собак отличались от требований, предъявляемых к росту МСК(ЖТ) человека. Например, bFGF и TGF- β 1 способствуют росту МСК(ЖТ) человека в культурах с БС. bFGF также поддерживает рост МСК(ЖТ) собак, в то время как TGF- β 1 негативно влияет на эти клетки и снижает клеточную пролиферацию.

Анализ научных данных, полученных другими коллективами, показал, что условия бессывороточного культивирования МСК интенсивно изучаются применительно к чело-

веку (Gottiparmula et al., 2013; Oikonomopoulos et al., 2015; Bui et al., 2021) лошади и собаке (Pilgrim et al., 2022). При этом используются БС, большинство из которых коммерчески доступны, поэтому их составы не раскрыты и не могут сравниваться. Расшифровка компонентов БС все еще редко встречается в литературе. Осложняет оценку перспективности использования этих сред неоднородность клеточных популяций МСК из-за отсутствия стандартных методов их выделения различными группами, что уменьшает возможность сопоставлять результаты. Кроме того, существенным сдерживающим фактором является как отсутствие специфических антител против антигенов лошади, так и отсутствие гена-маркера, экспрессия которого была бы специфична именно для этих клеток.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показывают, что размножение МСК лошади в БС MesenCult, предназначенной для культивирования МСК человека, возможно, так как клетки хорошо к ней адаптируются и сохраняют свойства, характерные для них при культивировании в среде ДМЕМ с СКПК: морфологию, скорость роста, время удвоения и митотический индекс, клонообразующие способности, диплоидный набор хромосом, высокую долю клеток с фенотипом CD90 и низкое с фенотипом CD31, CD34, способности к дифференцировке в адипо-, остео- и хондородогенном направлениях. МСК(ЖТ) лошади демонстрировали стабильные характеристики после культивирования в течение 10 пассажей в БС, что обеспечивает многообещающую основу для их дальнейшего использования. Наши результаты подчеркивают важность контроля качества, включая функциональные анализы, всех отдельных образцов МСК, которые будут использоваться в доклинических исследованиях или ветеринарной терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась за счет средств бюджета ФНЦ — Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (тема FGUG-2022-0010). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коровина Д.Г., Юров К.П., Алексеенкова С.В., Савченкова Е.А., Савченкова И.П.* 2017. Характеристика мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови лошадей. *Росс. Сельскохозяй. наука.* № 2. С. 51. (*Korovina D.G., Yurov K.P., Alexeenkova S.V., Savchenkova E.A., Savchenkova I.P.* 2017. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from equine umbilical cord blood. *Russian Agricultural Sci.* V. 43. P. 262). <https://doi.org/10.3103/S1068367417030090>
- Коровина Д.Г., Юров К.П., Волкова И.М., Алексеенкова С.В., Васильева С.А., Савченкова Е.А., Савченкова И.П.* 2015. Пуповинная кровь лошадей как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. *Коневодство и конный спорт.* № 6. С. 31. (*Korovina D.G., Yurov K.P., Volkova I.M., Alexeenkova S.V., Vasilyeva S.A., Savchenkova E.A., Savchenkova I.P.* 2015. Equine umbilical cord blood as a source of multipotent mesenchymal stem cells. *Horse breeding and equestrian sport.* No. 6. P. 31).
- Паюшина О. В., Цомартова Д.А., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Ломановская Т.А., Павлова М.С., Кузнецов С.Л.* 2023. Активация эндогенных мезенхимных стромальных клеток как подход к регенерации тканей. *Цитология.* Т. 65. № 2. С. 119–130. (*Payushina O. V., Tsomartova D.A., Chereshneva Ye.V., Ivanova M. u., Lomanovskaya T.A., Pavlova M.S., Kuznetsov S.L.* 2023. Activation of endogenous mesenchymal stromal cells as an approach to tissue regeneration. *Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya).* V. 17. No. 4. P. 328.) <https://doi.org/10.1134/S1990519X23040065>
- Тепляшин А.С., Коржикова С.В., Шарифуллина С.З., Чупикова Н.И., Ростовская М.С., Савченкова И.П.* 2005. Характеристика мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга и жировой ткани. *Цитология.* Т. 47. № 2. С. 130 (*Tepliashin A.S., Korzhikova S.V., Sharifullina S.Z., Chupikova N.I., Rostovskaia M.S., Savchenkova I.P.* 2005. Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tsitologiya.* V. 47. № 2. P.130.)
- Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M.* 2019. Mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells.* V. 37. P. 855. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Bhat S., Viswanathan P., Chandanala S., Prasanna S.J., Seetharam R.N.* 2021. Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Sci. Rep.* V. 11. P. 3403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83088-1>
- Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J.* 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* V. 2. P. 313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
- Borjesson D.L., Peroni J.F.* 2011. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics Lab. Med.* V. 31. P. 109. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.12.001>
- Caplan A.I.* 2017. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* V. 6. P. 1445. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Bui H.T.H., Nguyen L.T., Than U.T.T.* 2021. Influences of xeno-free media on mesenchymal stem cell expansion for clinical application. *Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 18. P.15. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00306-z>
- Chen C., Hou X., Jing F., Wang T., Feng L., Kang Y.J.* 2023. Alteration of ranscriptomic profile and antiseptic efficacy of adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells under different culture conditions. *Stem Cells Dev.* V. 32. P. 75. <https://doi.org/10.1089/scd.2022.0238>
- Clark K.C., Kol A., Shahbenderian S., Granick J.L., Walker N.J., Borjesson D.L.* 2016. Canine and equine mesenchymal stem cells grown in serum free media have altered immunophenotype. *Stem Cell Rev. Rep.* V.12 P. 245. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9638-0>
- Dam P.T.M., Hoang V.T., Bui H.T.H., Hang L.M., Hoang D.M., Nguyen H.P., Lien H.T., Tran H.T.T., Nguyen X.H., Nguyen T.L.* 2021. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells exhibit high HLA-DR levels and altered cellular characteristics under a xeno-free and serum-free condition. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 17. P. 2291. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10242-7>
- De Schauwer C., Meyer E., Van de Walle G.R., Van Soom A.* 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenol.* V. 75. P. 1431. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.008>

- Devireddy L.R., Myers M., Screven R., Liu Z., Boxer L.* 2019. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One*. V. 14: e0210250.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210250>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Gottipamula S., Muttigi M.S., Kolkundkar U., Seetharam R.N.* 2013. Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell Prolif.* V.46. P.608.
<https://doi.org/10.1111/cpr.12063>
- Govoni K.E.* 2015. Horse species symposium: use of mesenchymal stem cells in fracture repair in horses. *J. Anim. Sci.* V. 93. P. 871.
<https://doi.org/10.2527/jas.2014-8516>
- Hagen A., Niebert S., Brandt V.P., Holland H., Melzer M., Wehrend A., Burk J.* 2022. Functional properties of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured with equine platelet lysate. *Front. Vet. Sci.* V. 9: 890302.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.890302>
- Han Y., Yang J., Fang J., Zhou Y., Candi E., Wang J., Hua D., Shao C., Shi Y.* 2022. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* V. 7. P. 92.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
- Huang Y.C., Lai L.C.* 2019. The potential roles of stem cell-derived extracellular vesicles as a therapeutic tool. *Ann. Transl. Med.* V. 7. P. 693.
<https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.66>
- Ibrahim S., Saunders K., Kydd J.H., Lunn D.P., Steinbach F.* 2007. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* V. 119. P. 63.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.034>
- Jammes M., Contentin R., Cassé F., Galéra P.* 2023. Equine osteoarthritis: strategies to enhance mesenchymal stromal cell-based acellular therapies. *Front. Vet. Sci.* V. 10:1115774.
<https://doi.org/10.389/fvets.2023.1115774>
- Jones B.J., McTaggart S.J.* 2008. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp. Hematol.* V. 36. P. 733.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.006>
- Jung S., Panchalingam K.M., Rosenberg L., Behie L.A.* 2012. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int.* 123030.
<https://doi.org/10.1155/2012/123030>
- Karnieli O., Friedner O.M., Allickson J.G., Zhang N., Jung S., Fiorentini D., Abraham E., Eaker S.S., Yong T.K., Chan A., Griffiths S., Wehn A.K., Oh S., Karnieli O.* 2017. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy* V.19. P. 155.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.011>
- Kinzebach S., Bieback K.* 2013. Expansion of mesenchymal stem/stromal cells under xenogenic-free culture conditions. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* V. 129. P. 33.
https://doi.org/10.1007/10_2012_134
- Lee J.Y., Kang M.H., Jang J.E., Lee J.E., Yang Y., Choi J.Y., Kang H.S., Lee U., Choung J.W., Jung H., Yoon Y.C., Jung K.H., Hong S.S, Yi E.C., Park S.G.* 2022. Comparative analysis of mesenchymal stem cells cultivated in serum free media. *Sci. Rep.* V.12. P. 8620.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-12467-z>
- Menard C., Dulong J., Roulois D., Hebraud B., Verdier L., Pangault C., Sibut V., Bezier I., Bescher N., Monvoisin C., Gadelorge M., Bertheuil N., Flécher E., Casteilla L., Collas P. et al.* 2020. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* V. 38. P. 146.
<https://doi.org/10.1002/stem.3077>
- Moll G., Ankrum J.A., Kamhieh-Milz J., Bieback K., Ringden O., Volk H.D., Geissler S., Reinke P.* 2019. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines. *Trends Mol. Med.* V. 25. P. 149.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.006>
- Naskou M.C., Sumner S.M., Chocallo A., Kemelmakher H., Thoresen M., Copland I., Galipeau J., Peroni J.F.* 2018. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 75.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0823-3>
- Oikonomopoulos A., van Deen W.K., Manansala A.R., Lacey P.N., Tomakili T.A., Ziman A., Hommes D.W.* 2015. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: The effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep* V. 5. P. 16570. doi: 10.1038/srep16570

- Petrova V., Vachkova E.* 2023. Outlook of adipose-derived stem cells: challenges to their clinical application in horses. *Vet. Sci.* V.10. P. 348.
<https://doi.org/10.3390/vetsci10050348>.
- Pilgrim C.R., McCahill K.A., Rops J.G., Dufour J.M., Russell K.A., Koch T.G.* 2022. A review of fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stromal cells and potential alternatives for veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.* V. 9: 859025.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859025>.
- Platonova S.A., Viktorova E.V., Korovina D.G., Savchenkova I.P.* 2021. Equine tendinopathy therapy using mesenchymal stem cells. In: *KnE Life Scie/DonAgro: Int. Res. Conference on Challenges and Advances in Farming, Food Manufacturing, Agricultural Research and Education.* Dubai. UAE. P. 533.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/4/042069>
- Schubert S., Brehm W., Hillmann A., Burk J.* 2018. Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry A.* V. 93. P. 60.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23240>
- Vidal M.A., Walker N.J., Napoli E., Borjesson D.L.* 2012. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* V. 21. P. 273.
<https://doi.org/10.1089/scd.2010.0589>
- Viktorova E.V., Savchenkova I.P.* 2020. Multipotent mesenchymal stem cells in clinical veterinary practice. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* III Int. Sci. Conference: AGRITECH-III-2020: Agribusiness, Environ. Eng. Biotechnol. Krasnoyarsk Sci. Technol. City Hall of the Russian Union of Sci. and Eng. Associations. P. 72072.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/4/042038>
- Viswanathan S., Ciccocioppo R., Galipeau J., Krampera M., Le Blanc K., Martin I., Moniz K., Nolte J., Phinney D.G., Shi Y., Szczepiorkowski Z.M., Tarte K., Weiss D.J., Ashford P.* 2021. Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation-International Society for Cell and Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* V. 12. P. 1060.
[ηττπσ://doi.org/10.1016/j.cyt.2021.04.009](https://doi.org/10.1016/j.cyt.2021.04.009)
- Wang L.-T., Ting C.-H., Yen M.L., Liu K.-J., Sytwu H.-K., Wu K.K., Yen B.L.* 2016. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J. Biomed. Sci.* V. 23. P. 76.
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0289-5>
- Watanabe Y., Tsuchiya A., Terai S.* 2021. The development of mesenchymal stem cell therapy in the present, and the perspective of cell-free therapy in the future. *Clin. Mol. Hepatol.* V. 27. P. 70.
<https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0194>
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.* 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* V. 3. P. 4279.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

THE CULTURE OF EQUINE ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL CELLS IN SERUM-FREE MEDIA

I. P. Savchenkova*

*Federal Science Center Skryabin and Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 24/1,
Ryazanskii pr., Moscow, 109428, Russia*

** E-mail: s-ip@mail.ru*

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) isolated from equine adipose tissue (AT) represent a promising material for the creation of bioveterinary products for the prevention and treatment of many diseases. The production of these cells for clinical use requires improved serum-free culture conditions. The microenvironment can influence the properties of MSCs. It is believed that the requirements for culture conditions without animal blood serum are species specific. The purpose of this study was to evaluate the commercially available serum-free media (SFM) MesenCult (STEMCELL Technologies, USA), created for human MSCs, for the cultivation of equine MSC(AT). One part of the cells was propagated for 10 passages in the standard DMEM medium with a low glucose content (1 g/l) and 10% fetal bovine serum (FBS), and the second in SFM. The results show that the propagation of equine MSCs in MesenCult serum free, intended for the cultivation of human MSCs, is possible, since the cells adapt well to it and retain properties characteristic of cells that are cultured in DMEM with FBS: morphology, growth rate, doubling time and mitotic index, clone-forming abilities, diploid set of chromosomes, a large number of cells with the CD90 phenotype (90.8%) and low with the CD31 (0.8%), CD34 (0.9%) phenotype, as well as the potency for induction of differentiation into adipo-, osteo- and chondrogenic directions. Equine MSC(AT) showed stable characteristics after being cultured for 10 passages in SFM, providing a promising basis for their further use. Our results demonstrate that MesenCult media may be an alternative for serum-free culture of equine MSC(AT) for expansion in preclinical studies.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells, horse, adipose tissue, cultivation, MesenCult serum-free medium