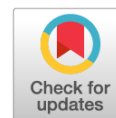


УДК 57.085.23

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar104363>

Научная статья



# Получение и культивирование мультипотентных мезенхимальных клеток стромы пуповины человека в лабораторном эксперименте

В.Е. Чернов, М.О. Соколова, А.К. Иванова, А.С. Бунтовская, Е.И. Корешова, А.Е. Трандина, А.С. Фрумкина, О.Н. Харкевич

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

**Актуальность.** Вартонов студень пуповины человека является одним из источников мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Популяция клеток, полученная из послеродового биоматериала, характеризуется высокими пролиферативными и регенераторными свойствами. Выделение культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из пуповины не представляет угрозы здоровью и жизни донора.

**Цель** — оптимизация условий для получения воспроизводимой популяции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток Вартонова студня пуповины человека для применения в клеточных технологиях, тканевой инженерии и перспективных технологиях военной медицины.

**Материалы и методы.** В исследовании апробированы основные приемы и методы выделения культуры клеток стромы пуповины, проведена оптимизация процесса культивирования для повышения его эффективности и сокращения сроков нарастания биомассы клеток. Исследовано влияние компонентов питательной среды на клетки, полученные из Вартонова студня пуповины человека. В настоящее время не существует универсального состава ростовой среды, в различных исследованиях используются питательные среды от разных производителей, отличающиеся составом. Наиболее обсуждаемым вопросом является подбор сыворотки, входящей в состав питательной среды.

**Результаты.** В работе проведена сравнительная оценка пяти различных сывороток. Показано, что наиболее стабильные физиологические показатели наблюдаются у образцов суспензии клеток при добавлении сывороток FBS (SKPK, Россия) и FBS (Capricorn, США). Исследование влияния гипоксии на культуру клеток в сочетании с наиболее эффективными сыворотками, показало, что гипоксический стресс действует как активатор первичной пролиферации клеток. Оценка влияния сыворотки и гипоксии на культуру клеток проводилась визуально при микроскопии, в зависимости от изменений морфологии клеток при культивировании и результатов тестирования действия сывороток по интенсивности дыхания свободных и иммобилизованных клеток при действии ингибиторов дыхательного метаболизма.

**Заключение.** В результате экспериментов установлено влияние типа сыворотки на инициацию экспансии клеток из первичных эксплантов и дальнейшую пролиферацию клеток *in vitro*. Гипоксия при экспозиции первичных эксплантов усиливает экспансию клеток из ткани фрагментов Вартонова студня.

**Ключевые слова:** Вартонов студень пуповины; клеточные технологии; клеточный метаболизм; культивирование мезенхимальных клеток; мультипотентные мезенхимальные клетки стромы; провизорные органы; эксплант.

## Как цитировать:

Чернов В.Е., Соколова М.О., Иванова А.К., Бунтовская А.С., Корешова Е.И., Трандина А.Е., Фрумкина А.С., Харкевич О.Н. Получение и культивирование мультипотентных мезенхимальных клеток стромы пуповины человека в лабораторном эксперименте // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2022. Т. 41. № 3. С. 283–291. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar104363>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar104363>

Research Article

# Iniciation and cultivation of multipotent mesenchymal human umbilical stroma cells in a laboratory experiment

Vladimir E. Chernov, Margarita O. Sokolova, Anastasia K. Ivanova, Aleksandra S. Buntovskaya, Elena I. Koreshova, Aleksandra E. Trandina, Anna S. Frumkina, Ol'ga N. Kharkevich

Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

**BACKGROUND:** Wharton's jelly of the human umbilical cord is one of the sources of multipotent mesenchymal stromal cells. The cell population obtained from the postpartum biomaterial is characterized by high proliferative and regenerative properties. Isolation of a culture of multipotent mesenchymal stromal cells from the umbilical cord does not pose a threat to the health and life of the donor.

**AIM:** Optimization of the technique for isolating a reproducible population of multipotent mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly is an urgent task in biomedicine, which can accelerate the process of obtaining donor cells for cell therapy and tissue engineering.

**MATERIALS AND METHODS:** In the study, the main techniques and methods for isolating the culture of umbilical cord stroma cells were tested, the cultivation process was optimized to increase its efficiency and reduce the time of growth of cell biomass. The effect of the components of the nutrient medium on the cells obtained from Wharton's jelly of the human umbilical cord was studied. Currently, there is no universal composition of the growth medium; in various studies, nutrient media from different manufacturers are used, which differ in composition. The most discussed issue is the selection of serum, which is part of the nutrient medium.

**RESULTS:** In the work, a comparative evaluation of five different sera was carried out. It has been shown that the most stable physiological parameters are observed in cell suspension samples with the addition of FBS (SKPK, Russia) and FBS (Capricorn, USA) sera. A study of the effect of hypoxia on cell culture in combination with the most effective sera showed that hypoxic stress acts as an activator of primary cell proliferation. The assessment of the effect of serum and hypoxia on cell culture was carried out visually using microscopy, assessment of changes in cell morphology during cultivation, and the results of testing the action of sera by the intensity of respiration of free and immobilized cells under the action of inhibitors.

**CONCLUSION:** As a result of the experiments, the influence of the type of serum on the initiation of cell expansion from primary explants and further cell proliferation *in vitro* was established. Hypoxia during exposure of primary explants enhances the expansion of cells from tissue fragments of Wharton's jelly tissue.

**Keywords:** cell metabolism; cell technology; explants; mesenchymal cell culture; multipotent mesenchymal stromal cells; provisional organs; Varton's umbilical cord jelly.

## To cite this article:

Chernov VE, Sokolova MO, Ivanova AK, Buntovskaya AS, Koreshova EI, Trandina AE, Frumkina AS, Kharkevich ON. Iniciation and cultivation of multipotent mesenchymal human umbilical stroma cells in a laboratory experiment. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2022;41(3):283–291. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar104363>

Received: 02.03.2022

Accepted: 13.09.2022

Published: 30.09.2022

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Применение аллогенных клеточных продуктов в медицинской практике является перспективной областью биомедицины, нуждающейся в развитии быстрых и малоинвазивных способов получения донорских клеток. На сайте [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) по состоянию на 2021 г. зарегистрировано 10 781 зарубежное исследование, касающееся применения в медицинской практике мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). При этом значительная их доля посвящена изучению потенциала применения ММСК пуповины при различных заболеваниях. Провизорные органы как внеэмбриональные структуры после рождения ребенка утрачивают свою значимость и в то же время представляют ценность как источник для получения культуры ММСК *in vitro*, обладающий высоким пролиферативным и регенераторным потенциалом, а также простотой, неинвазивностью и невысокой затратностью получения.

В ряде публикаций сообщается о слабой иммуногенной активности тканей пуповины человека, некоторыми исследованиями была продемонстрирована успешность применения ММСК пуповины при различных заболеваниях [1]. Было показано, что ММСК, полученные из Вартонова студня пуповины, безопасны в применении и обладают значительным противовоспалительным эффектом [2]. Например, применение их при диабетической нефропатии задерживало прогрессирование заболевания и оказывало репаративное воздействие на поврежденные ткани и функцию почек<sup>1</sup>. Подчеркивается также успешность применения ММСК пуповины при лечении остеоартрита [3]. Результаты этих исследований свидетельствуют об актуальности дальнейшей разработки протоколов получения ММСК Вартонова студня пуповины человека для применения их как компонента биомедицинских клеточных продуктов и тканеинженерных конструкций [4].

Методика получения ММСК Вартонова студня пуповины в настоящее время не имеет строгого регламента, поэтому существует необходимость оптимизации ее таким образом, чтобы высокий уровень продукции клеточного материала воспроизводился при каждой эксплантации. Представленные в литературе данные о способах выделения клеток из тканей пуповины человека многообразны, в связи с чем существует необходимость их систематизации и выбора оптимальных вариантов лабораторных и технологических решений для воспроизводимого культивирования ММСК [5]. Помимо процедуры выделения клеток для последующего увеличения популяции требуется оптимизация условий культивирования, оценки качества и жизнеспособности полученных клеток. Среди методов, позволяющих стимулировать миграцию клеток

из экплантов и их пролиферацию в культуре *in vitro*, используют гипоксический стресс при первичной эксплантации [6]. Применяют увеличение процента содержания сыворотки в ростовой среде для культивирования и различные составы ростовых сред [7]. Свойства сыворотки, используемой как компонент ростовой среды, в силу множества факторов, влияющих на ее состав при производстве, могут значительно отличаться, что отражается на результате получения первичной культуры клеток [8]. В последние годы применяется замещение фетальной сыворотки крови животных аутологичной сывороткой пациента или применение бессывороточных сред. Такие методы снижают продуктивность процесса культивирования, но являются предпочтительными для клеточной терапии [9]. Одним из методов оценки влияния компонентов питательных сред на жизнеспособность клеток и динамику физиологических процессов в культуре ткани используют измерение интенсивности дыхания. [10]. Изменение интенсивности дыхания (выделения  $O_2$ ) или гликолиза (образования  $CO_2$ ), индуцируемое компонентами питательной среды, может быть инструментально измерено и является зависимым от дозы изменяемого компонента [11].

Следует отметить, что при работе с тканевыми эксплантами *in vitro* есть вероятность миграции из фрагмента ткани клеток других типов, не характерных для ткани выбранного экспланта. Это могут быть эндотелиальные, гладкомышечные клетки стенки сосудов, способные к адгезии клетки крови, не имеющие паракринной активности ММСК и несущие на своей поверхности специфические молекулы гистосовместимости [12]. Это создает препятствие к применению аллогенных клеток и предполагает необходимость иммунофенотипирования полученной популяции. Наличие поддерживающих функций внеклеточного матрикса, а также высвобождение факторов роста из тканевого экспланта оказывают стимулирующее воздействие на продуктивность культивирования клеток [13].

Целью нашей работы была оптимизация условий для получения воспроизводимой популяции ММСК Вартонова студня пуповины человека для применения в клеточных технологиях, тканевой инженерии и перспективных технологиях военной медицины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ткань пуповины получали от 6 здоровых доноров в возрасте 25–35 лет после получения информированного согласия при операции планового кесарева сечения на основании заключения этического комитета № 230 от 17.12.2019 г. Полученные образцы немедленно транспортировали в лабораторию в стерильном физиологическом растворе. Для эксплантации отбирали участки Вартонова студня без сосудов и фрагментов амниотической мембраны пуповины. Экспланты высевали в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> и культивировали до формирования монослоя в течение 21 сут в ростовой

<sup>1</sup> Clinical Research of UC-MSCs in the Treatment of Diabetic Nephropathy (UC-MSCs) Identifier: NCT04562025 [Electronic resource]. – URL: <http://https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04562025> (date of treatment: 24.09.2020).

**Таблица 1.** Сыворотки, использованные в эксперименте для культивирования клеток пуповины

№ п/п	Сыворотка	Сокращенное название	Производитель
1	Fetal Bovine Serum	FBS <sub>G</sub>	Gibco, США
2	Fetal Bovine Serum	FBS <sub>HC</sub>	HyClone, США
3	Fetal Bovine Serum	FBS <sub>C</sub>	Capricorn, США
4	Сыворотка крупного рогатого скота	KPC	Биолот, Россия
5	Fetal Bovine Serum SKPK	FBS <sub>S</sub>	Биолот, Россия

среде, состоящей из DMEM F/12 с добавлением 10 % сыворотки KPC (Биолот, Россия) ( $n = 6$ ), 10 % фетальной сыворотки FBS (Gibco, США) ( $n = 6$ ), 10 % фетальной сыворотки FBS (Capricorn, Германия) ( $n = 6$ ). Для оценки влияния сывороток на митохондриальное дыхание клеток использовали также среду с фетальными сыворотками FBS (HyClone, США) ( $n = 6$ ) и FBS (SKPK, Россия) ( $n = 6$ ) в 10 % концентрации. Список сывороток, использованных в экспериментах, приведен в табл. 1.

Культуру клеток культивировали при температуре 37 °C, содержании 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфере инкубатора и относительной влажности 95 %. Неполную (30–50 %) замену ростовой среды производили каждые 3–4 сут. Интенсивность роста популяции клеток оценивали визуально при помощи инвертированного микроскопа Primovert (Carl Zeiss, Германия). При формировании монослоя клетки снимали смесью трипсина-Версена в соотношении 1 : 3 и подсчитывали число клеток вручную и на автоматическом счетчике клеток TC20 (BioRad, США).

Иммунофенотипирование полученной культуры не проводили. Для исключения вероятности преимущественного прорастания остаточных гладкомышечных клеток сосудов пуповины популяцию клеток 1 пассажа иммуноцитохимически окрашивали на наличие гладкомышечного актина (*α-smooth muscle actin*) (Sigma, Япония). Препараты фиксировали смесью ацетона и этилового спирта в соотношении 1 : 1, первичные антитела наносили на препараты в разведении 1 : 500 и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °C во влажной камере. Применяли вторичные антитела, конъюгированные с флюорохромом AlexaFluor 488 (Abcam, Англия), ядра докрашивали средой для заключения препаратов SlowFade Glass Soft-set Antifade Mountant с DAPI Nuclear (Invitrogen, США). Наблюдения проводили на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Флюоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, детекцией 410–495 нм и аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, детекцией 495–605 нм.

Для оценки активности действия фетальных сывороток в ростовой среде был поставлен эксперимент по измерению интенсивности митохондриального дыхания клеток при воздействии четырех фетальных сывороток, применяемых в наших экспериментах. Тип и происхождение сывороток приведены в табл. 1. При этом действие сыворотки KPC в эксперименте с оценкой интенсивности

дыхания не исследовалось, поскольку роста клеток на среде с этой сывороткой не наблюдалось. Интенсивность дыхания суспензии клеток, полученных из пуповины, при воздействии стрессовых факторов — блокаторов дыхания: олигомицина, антимицина А и FCCP (карбонилцианид-*п*-(трифторметокси) фенилгидразон) — оценивали по скорости поглощения кислорода, которую вычисляли по динамике изменения концентрации растворенного O<sub>2</sub> в ростовой среде, содержащей 10 % сывороток, указанных в табл. 1.

1. Измерения осуществляли на анализаторе клеточного метаболизма XFe 96 SeaHors (Agilent Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки влияния компонентов питательной среды на жизнеспособность и интенсивность митохондриального дыхания популяции клеток пуповины применялись 4 различные сыворотки: FBS<sub>G</sub>, FBS<sub>HC</sub>, FBS<sub>S</sub>, FBS<sub>C</sub>. Сыворотка KPC при этом не использовалась.

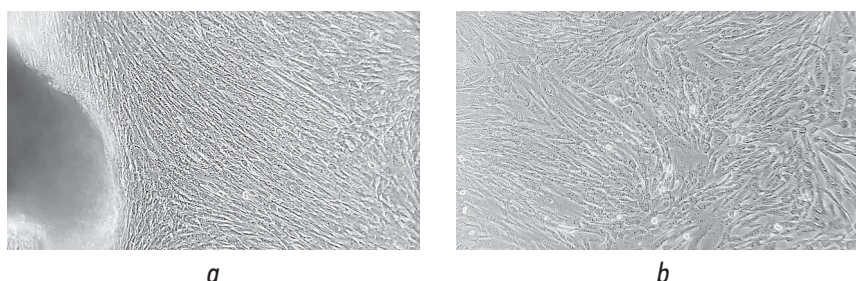
2. Результаты, полученные при первичной эксплантации фрагментов Вартонова студня, сравнивали после вычисления ошибки процента [14]. Статистическая обработка и представление результатов интенсивности дыхания производились при помощи встроенных программ анализатора SeaHors автоматически в процессе работы прибора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Начало миграции одиночных клеток из эксплантов во всех экспериментальных группах отмечали на 6-е сут после эксплантации. Наиболее активный рост выявлялся в фрагментах, захватывающих периферические участки ткани, прилегающие к стенке пуповины (рис. 1). Эксплантация ткани Вартонова студня периферической части сосудов не приводила к формированию монослоя в культуре. В течение эксперимента отмечали появление в культуральных флаконах взвеси вследствие постепенного разрушения коллагенового матрикса эксплантов.

В течение эксперимента не было получено 100 % эффективности прорастания очага клеток от каждого экспланта ткани пуповины во всех опытных группах. Данные о частоте прорастания эксплантов и количестве клеток, полученных на 21-е сут культивирования, представлены в табл. 2.





**Рис. 1.** Клетки пуповины, полученные от экспланта на 21-е сут культивирования. Инвертированная микроскопия, увеличение  $\times 100$  (a),  $\times 200$  (b)

**Таблица 2.** Результаты культивирования клеток пуповины на ростовых средах, содержащих различные сыворотки

Признак	Вариант сыворотки		
	КРС, Биолот	FBS <sub>G</sub> , Gibco	FBS <sub>C</sub> , Capricorn
Морфология клеток	Эпителиоподобная с преобладанием цитоплазмы	Фибробластная	Фибробластная
Формирование монослоя	–	+	+
Общее количество эксплантов, ед.	36	36	72
Количество эксплантов с пролиферацией, ед	0	6	13
Эффективность пролиферации, %	0	16,67 ± 6,127	18,06 ± 4,534
Общее количество клеток, кл/мл	Единичные клетки	7,07 × 10 <sup>4</sup>	8,43 × 10 <sup>5</sup>
Выживаемость клеток, %	–	69 ± 0,0303	95 ± 0,0237

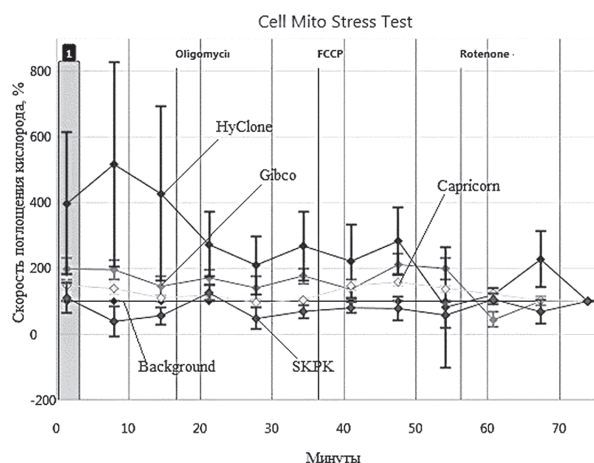
В течение эксперимента отмечали появление полиморфных клеточных колоний. При использовании сыворотки КРС монослойной культуры при эксплантации клеток пуповины человека получено не было, наблюдали одиночные эпителиоподобные клетки с преобладанием цитоплазмы в ядерно-цитоплазматическом соотношении. При использовании фетальных сывороток FBS<sub>G</sub> и FBS<sub>C</sub> отмечалось формирование монослоя и фибробластная морфология клеток, при этом наблюдали одинаковую частоту формирования зон роста вокруг эксплантов в присутствии каждой из сывороток в ростовой среде. В ходе эксперимента максимальное количество клеточного материала было получено при культивировании на ростовой среде, включающей сыворотку FBS<sub>C</sub>, процент жизнеспособных клеток при этом был наиболее высоким и составил 95 % от общего числа учтенных клеток.

При тестировании сывороток по критерию оценки интенсивности дыхания свободных и иммобилизованных клеток установлено, что действие сывороток различного происхождения на состояние полученных клеток различается (рис. 2).

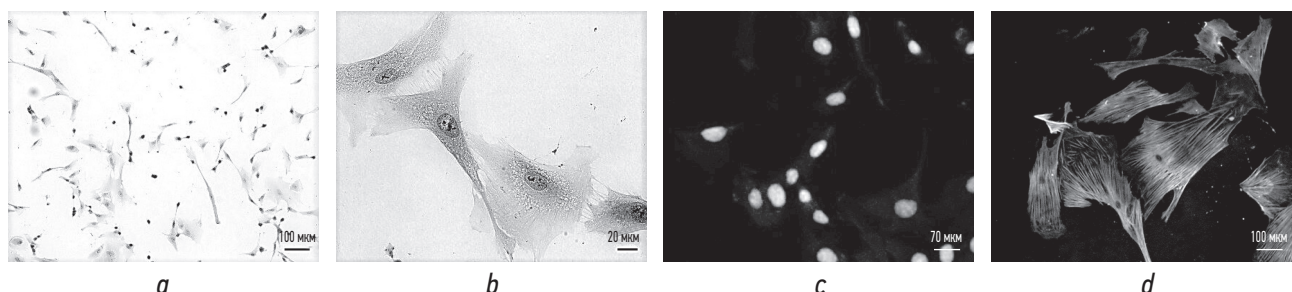
Максимально интенсивное базовое дыхание наблюдалось при нахождении суспензии клеток в ростовой среде, содержащей 10 % сыворотки FBS<sub>HC</sub>. Наиболее стабильные показатели дыхания, как базового, так и при воздействии антибиотиков, блокирующих циклы дыхательного метаболизма, наблюдаются у образцов суспензии клеток

при воздействии сывороток FBS<sub>S</sub> и FBS<sub>C</sub>. Интенсивность дыхания суспензии клеток в ростовой среде, содержащей фетальную сыворотку производителя FBS<sub>G</sub>, незначительно изменялась как при измерении базового дыхания, так и при воздействии блокаторов компонентов дыхательного метаболизма, оставаясь относительно стабильной в течение всего процесса измерения.

При иммуногистохимическом исследовании присутствия в цитоплазме  $\alpha$ -smooth muscle actin не выявлено, отмечалось появление автофлуоресценции.



**Рис. 2.** Динамика интенсивности дыхания клеток пуповины при действии стрессовых факторов-блокаторов дыхания на фоне фетальных сывороток различного происхождения



**Рис. 3.** Популяция клеток пуповины, полученная при использовании сыворотки FBSC. Окрашивание гематоксилином и эозином (*a, b*), иммуноцитохимическая реакция на гладкомышечный  $\alpha$ -актин клеток, полученных из пуповины (*c*), миометрия (*d*)

Специфического окрашивания цитоскелета, характерного для гладкомышечных клеток, в исследуемых популяциях получено не было (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Получение первичной культуры ММСК Вартонова студня пуповины человека сопряжено с рядом трудностей. В настоящее время не существует универсального состава ростовой среды, в различных исследованиях используются питательные среды от разных производителей, отличающиеся составом. Наиболее обсуждаемым вопросом является подбор сыворотки, входящей в состав питательной среды. Концентрация и тип сыворотки, применяемой как компонент ростовой среды, является одним из ключевых факторов, поддерживающих рост клеток. В различных исследованиях используются питательные среды от разных производителей, отличающиеся составом. В ходе работы было установлено влияние применяемой сыворотки на скорость и плотность формирования колоний вокруг эксплантов. Сыворотка, полученная из крови взрослого животного (КРС), не инициировала индукцию пролиферации и миграции клеток при эксплантации фрагментов ткани пуповины, и монослойной культуры клеток в течение эксперимента получено не было. Это можно объяснить отсутствием в сыворотке крови взрослого животного факторов, способствующих миграции клеток из экспланта [6]. В присутствии фетальных сывороток происходил очаговый рост вокруг эксплантов, однако уровень продукции клеточного материала спустя 21 сут культивирования существенно различался. В литературе имеются данные о том, что свойства фетальных сывороток различных производителей могут значительно варьировать [7]. В нашем эксперименте присутствие  $FBS_C$  в ростовой среде стимулировало максимальную пролиферацию новых клеток. Во всех группах в течение эксперимента в ростовой среде отмечалось умеренное количество взвеси, представленной фрагментами внеклеточного матрикса пуповины. Также известно, что присутствие фрагментов разрушающегося коллагена и протеогликанов в культуре способно выступать в роли проапоптотических индукторов, снижающих темп роста популяции [5, 12]. При незапланированной эксплантации

фрагментов сосудов пуповины, периодически происходившей в ходе экспериментов, формирования колоний вокруг экспланта не наблюдалось, регистрировалась адгезия лишь одиночных клеток. Экспланция фрагментов ткани Вартонова студня, граничащих со стенками пуповины, приводила к формированию крупных колоний при интенсивной пролиферации клеток. Отсутствие иммунной реакции с маркером  $\alpha$ -smooth muscle actin, являющимся специфическим маркером цитоскелета гладкомышечных клеток, в том числе миофибробластов и гладкомышечных клеток сосудов, характеризующихся быстрой пролиферацией в культуре *in vitro*, позволило предположить принадлежность полученной популяции к мезенхимальным клеткам с интенсивным ростом. Полученные в этом эксперименте результаты соотносятся с данными других литературных источников, в которых отмечается, что свойства сыворотки, используемой как один из основных компонентов ростовой среды, могут значительно отличаться, что отражается на результате получения первичной культуры клеток [7].

Морфологический анализ колоний, формируемых вокруг эксплантов, демонстрировал отличия в фенотипе клеток на 21-е сут культивирования. При использовании фетальных сывороток преобладала фибробластная морфология, при использовании сыворотки крови взрослого животного — эпителиоидная, с преобладанием цитоплазмы в ядерно-цитоплазматическом соотношении. Оценка интенсивности митохондриального дыхания клеток при присутствии в ростовой среде различных сывороток позволила получить информацию о состоянии жизнеспособности клеток, находящейся в прямой зависимости от уровня поглощения кислорода их популяцией. Анализ интенсивности потребления кислорода суспензией клеток показал, что наиболее интенсивное базовое дыхание наблюдается у суспензии клеток при воздействии сыворотки  $FBS_{HC}$ . Наиболее стабильные показатели дыхания как базового, так и при воздействии антибиотиков, блокирующих циклы дыхательного метаболизма, наблюдались у образцов суспензии клеток при воздействии фетальных сывороток  $FBS_C$  и  $FBS_C$ . Результаты, полученные при оценке интенсивности дыхания клеток, позволяют разделить сыворотки в зависимости от их воздействия на интенсивность дыхания на три группы: сыворотка, усиливающая интенсивность базового дыхания ( $FBS_{HC}$ ); сыворотки,

поддерживающие стабильную интенсивность как базового дыхания, так и поглощения кислорода при действии блокаторов дыхательных циклов ( $FBS_g$ ;  $FBS_c$ ), и сыворотка, угнетающая базовое дыхание ( $FBS_s$ ). Монослойные, хорошо растущие клеточные культуры были получены в присутствии в ростовой среде сывороток, при действии которых интенсивность дыхания менялась слабо, а сыворотка, усиливающая базовое дыхание, стимулировала экспансию клеток из эксплантов, но снижала интенсивность дальнейшего роста культуры. Эти результаты позволяют считать, что воздействие, оказываемое компонентами различных сывороток, различающихся происхождением, способно стимулировать миграцию и пролиферацию клеток пуповины при получении первичной культуры. Но для оптимизации состава питательных сред, выбора оптимальной сыворотки, а также для большей эффективности процессов экспансии и сохранения жизнеспособности полученных клеток необходимо продолжение экспериментов. Известно, что усиление интенсивности дыхания связано с интенсивностью действия факторов, вызывающих реакцию стресса клеток [15]. Применение метода измерения интенсивности митохондриального дыхания позволяет дать оценку устойчивости дыхания клеток при воздействии суммы компонентов сывороток в сравнении с действием стрессовых факторов, блокаторов циклов дыхательного метаболизма. Возможно, это позволит с большей эффективностью выбирать компоненты питательных сред и прогнозировать жизнеспособность клеток в течение эксперимента.

Продуктивность получения культуры клеток Вартонова студня пуповины характеризуется некоторыми закономерностями. Во-первых, умеренное присутствие факторов стресса, таких как гипоксия, положительно влияет на скорость миграции клеток из экспланта и продуктивность культивирования. Во-вторых, существует определенная зависимость от типа и качества сыворотки, применяемой при культивировании клеток [14]. В результате работы апробирован протокол воспроизводимого получения культуры МСК Вартонова студня пуповины человека, проведена оценка эффективности применения фетальных сывороток различных производителей, методом иммунофенотипирования исключена вероятность пролиферации гладкомышечных клеток сосудов при эксплантации фрагментов Вартонова студня пуповины человека. Гипоксия положительно влияет на скорость миграции клеток из экспланта и продуктивность культивирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калужная Л.И., Харкевич О.Н., Шмидт А.А., Протасов О.В. Регенераторные свойства внеэмбриональных органов человека в тканевой инженерии // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2018. № 4. С. 192–198.
2. Третьяк С.И., Жура А.В., Хрыщанович В.Я., и др. Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на воспалительную

*Выводы.* 1. Кратковременная гипоксия влияет на эффективность миграции клеток из экспланта. 2. Сыворотки различного происхождения оказывают различное действие на интенсивность митохондриального дыхания мезенхимальных, клеток полученных из пуповины человека. 3. Наиболее эффективной сывороткой из изученных является фетальная сыворотка Capricorn ( $FBS_c$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании апробированы основные приемы и методы получения культуры мезенхимальных клеток пуповины человека, проведена оптимизация условий получения воспроизводимой популяции клеток Вартонова студня пуповины. Установлено, что кратковременная гипоксия и тип сыворотки, используемой как компонент ростовой среды, оказывают влияние на скорость и продуктивность роста популяции. Метод измерения митохондриального дыхания может быть использован для оценки действия сывороток, применяемых как компонент питательной среды для культуры клеток пуповины.

Применение аллогенных клеточных продуктов в медицинской практике является перспективной областью биомедицины, нуждающейся в развитии быстрых и малоинвазивных способов получения донорских клеток. Первичная культура ММСК, получаемая из провизорных органов, представляет ценность как клеточный материал, обладающий высоким пролиферативным и регенераторным потенциалом, а также характеризующийся простотой, неинвазивностью и невысокой затратностью получения.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Эксплант».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Этическая экспертиза.** Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ (протокол № 230 от 17.12.2019 г.).

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

реакцию при травме париетальной брюшины в эксперименте // Медицинский журнал. 2018. № 4. С. 99–104.

3. Matas J., Orrego M., Amenabar D., et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II



Trial // *Stem Cells Transl. Med.* 2019. Vol. 8, No. 3. P. 215–224. DOI: 10.1002/sctm.18-0053

4. Александров В.Н., Камилова Т.А., Мартынов Б.В., Калужная Л.И. Клеточная терапия при ишемическом инсульте // *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 2013. Т. 3, № 43. С. 199–205.

5. Шаманская Т.В., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток *ex vivo* для клинического использования // *Онкогематология.* 2009. № 3. С. 69–76.

6. Galluzzi L., Yamazaki T., Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, No. 11. P. 731–745. DOI: 10.1038/s41580-018-0068-0

7. Lee J.-S., Kim S.K., Jung B.-J., et al. Enhancing proliferation and optimizing the culture condition for human bone marrow stromal cells using hypoxia and fibroblast growth factor-2 // *Stem Cells Research.* 2018. Vol. 28. P. 87–95. DOI: 10.1016/j.scr.2018.01.010

8. Зорин В.Л., Копнин П.Б., Зорина А.И., и др. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека // *Гены & Клетки.* 2014. Т. 9, № 2. С. 53–60.

9. Nakamura T., Shirouzu T., Nakata K., Ushigome H. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analy-

sis Goes to the Next Stage // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, No. 18. Art. 4544. DOI: 10.3390/ijms20184544

10. Бидей С.П., Броделиус П., Кабрал И.М., и др. Иммуобилизованные клетки и ферменты: Методы / Под ред. Дж. Вудворда; Перевод с англ. Е.В. Дайниченко, Г.П. Самохина; Под ред. И.В. Березина. М.: Мир, 1988. 215 с.

11. Конки Д., Эрба Э., Фрешни Р., и др. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни; Перевод с англ. М.А. Панова. М.: Мир, 1989. 332 с.

12. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues // *Cell Prolif.* 2017. Vol. 50, No. 2. Art. e12334. DOI: 10.1111/cpr.12334

13. Резвова М.А., Овчаренко Е.А., Никишев П.А., и др. Перспективы использования триблок-сополимеров Sibs в кардиохирургии: *in vitro* и *in vivo* исследование в сравнении с ePTFE // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2019. Т. 21, № 4. С. 67–80.

14. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.

15. Estrada J.C., Albo C., Benguria A., et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis // *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19, No. 5. P. 743–755. DOI: 10.1038/cdd.2011.172

## REFERENCES

1. Kalyuzhnaya LI, Kharkevich ON, Shmidt AA, Protasov OV. Regenerative properties of human extraembryonal organs in tissue engineering. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2018;(4):192–198. (In Russ.) DOI: 10.17816/brmma12359

2. Tretyak SI, Zhura AV, Khryshchanovich VYa, et al. The influence of allogeneic stem cells to inflammatory response in peritoneum injury in experiment. *Medical Journal.* 2018;(4):99–104. (In Russ.)

3. Matas J, Orrego M, Amenabar D, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial. *Stem Cells Transl. Med.* 2019;8(3): 215–224. DOI: 10.1002/sctm.18-0053

4. Alexandrov VN, Kamilova TA, Martynov BV, Kalyuzhnaya LI. Cell therapy in ischemic stroke. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2013;3(43):199–205. (In Russ.)

5. Shamanskaya TV, Osipova EYu, Rumyantsev SA. Mesenchymal stem cells *ex vivo* cultivation technologies for clinical use. *Onkologematologiya.* 2009;(3):69–76. (In Russ.)

6. Galluzzi L, Yamazaki T, Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19(11):731–745. DOI: 10.1038/s41580-018-0068-0

7. Lee J-S, Kim SK, Jung B-J, et al. Enhancing proliferation and optimizing the culture condition for human bone marrow stromal cells using hypoxia and fibroblast growth factor-2. *Stem Cells Research.* 2018;28:87–95. DOI: 10.1016/j.scr.2018.01.010

8. Zorin VL, Koptin PB, Zorina AI, et al. Optimization of conditions of skin and gingival mucosa derived human fibroblasts

obtainment and cultivation. *Geny & Kletki.* 2014;9(2):53–60. (In Russ.)

9. Nakamura T, Shirouzu T, Nakata K, Ushigome H. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4544. DOI: 10.3390/ijms20184544

10. Bidey SP, Brodelius P, Kabral IM, et al. *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach.* Woodward J., editor; Berezin IV, editor, Daynichenko EV, Samokhin GP, translated from English. Moscow: Mir Publisher; 1988. 215 p. (In Russ.)

11. Konki D, Erba E, Freshney R, et al. *Animal cell culture: A Practical Approach.* Freshney RI, editor; Panov MA, translated from English. Moscow: Mir Publisher; 1989. 332 p. (In Russ.)

12. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif.* 2017;50(2):e12334. DOI: 10.1111/cpr.12334

13. Rezvova MA, Ovcharenko EA, Nikishev PA, et al. The use of sibs triblock copolymers in cardiac surgery: *in vitro* and *in vivo* studies in comparison with eptfe. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2019;21(4):67–80. (In Russ.)

14. Zaicev GN. *Mathematical statistics in experimental botany.* Moscow: Nauka Publisher; 1984. 424 p. (In Russ.)

15. Estrada JC, Albo C, Benguria A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012;19(5): 743–755. DOI: 10.1038/cdd.2011.172



## ОБ АВТОРАХ

**Владимир Евгеньевич Чернов**, старший научный сотрудник научно-исследовательского центра; eLibrary SPIN: 8315-1161; Author ID: 88918; e-mail: [vechernov@mail.ru](mailto:vechernov@mail.ru)

**\*Мargarita Олеговна Соколова**, научный сотрудник научно-исследовательского центра; адрес: Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3457-4788>; eLibrary SPIN: 3683-6054; Author ID: 1016305; e-mail: [sokolova.rita@gmail.com](mailto:sokolova.rita@gmail.com)

**Анастасия Константиновна Иванова**, препаратор научно-исследовательского центра; eLibrary SPIN: 6804-1474; Author ID: 1155274; e-mail: [fullmetal1999@mail.ru](mailto:fullmetal1999@mail.ru)

**Александра Сергеевна Бунтовская**, врач клинической лабораторной диагностики научно-исследовательского центра; eLibrary SPIN: 5092-1833; Author ID: 887917; e-mail: [sandrarebel@mail.ru](mailto:sandrarebel@mail.ru)

**Елена Игоревна Корешова**, врач клинической лабораторной диагностики научно-исследовательского центра; eLibrary SPIN: 5310-0605; Author ID: 1089008; e-mail: [koreshova1993@mail.ru](mailto:koreshova1993@mail.ru)

**Александра Евгеньевна Трандина**, врач клинической лабораторной диагностики научно-исследовательского центра; eLibrary SPIN: 6089-3495; Author ID: 1089010; e-mail: [sasha-trandina@rambler.ru](mailto:sasha-trandina@rambler.ru)

**Анна Сергеевна Фрумкина**, врач акушер-гинеколог кафедры акушерства и гинекологии; eLibrary SPIN: 5109-0579; Author ID: 1089372; e-mail: [annafrumkin@mail.ru](mailto:annafrumkin@mail.ru)

**Ольга Николаевна Харкевич**, профессор кафедры акушерства и гинекологии; eLibrary SPIN: 7591-5730; Author ID: 845536; e-mail: [kharkevich.olga@mail.ru](mailto:kharkevich.olga@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

**Vladimir E. Chernov**, Senior Researcher of Research Center; eLibrary SPIN: 8315-1161; Author ID: 88918; e-mail: [vechernov@mail.ru](mailto:vechernov@mail.ru)

**\*Margarita O. Sokolova**, Researcher of Research Center; address: 6, Akademika Lebedeva str., Saint Peterburg, 194044, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3457-4788>; eLibrary SPIN: 3683-6054; Author ID: 1016305; e-mail: [sokolova.rita@gmail.com](mailto:sokolova.rita@gmail.com)

**Anastasia K. Ivanova**, Preparator of Research Center; eLibrary SPIN: 6804-1474; Author ID: 1155274; e-mail: [fullmetal1999@mail.ru](mailto:fullmetal1999@mail.ru)

**Aleksandra S. Buntovskaya**, M.D., doctor of clinical laboratory diagnostics of Research Center; eLibrary SPIN: 5092-1833; Author ID: 887917; e-mail: [sandrarebel@mail.ru](mailto:sandrarebel@mail.ru)

**Elena I. Koreshova**, M.D., doctor of clinical laboratory diagnostics of Research Center; eLibrary SPIN: 5310-0605; Author ID: 1089008; e-mail: [koreshova1993@mail.ru](mailto:koreshova1993@mail.ru)

**Aleksandra E. Trandina**, M.D., doctor of clinical laboratory diagnostics of Research Center; eLibrary SPIN: 6089-3495; Author ID: 1089010; e-mail: [sasha-trandina@rambler.ru](mailto:sasha-trandina@rambler.ru)

**Anna S. Frumkina**, obstetrician-gynecologist of department of obstetrics and gynecology; eLibrary SPIN: 5109-0579; Author ID: 1089372; e-mail: [annafrumkin@mail.ru](mailto:annafrumkin@mail.ru)

**Ol'ga N. Kharkevich**, M.D., Professor of Obstetrics and Gynecology Department; eLibrary SPIN: 7591-5730; Author ID: 845536; e-mail: [kharkevich.olga@mail.ru](mailto:kharkevich.olga@mail.ru)