

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ИХ СПОСОБНОСТЬ К ПРОДУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

А. Г. Полешко, А. В. Водопьянова, С. В. Пинчук, О. И. Чиж, З. Б. Квачева

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

На сегодня актуальным является разработка оптимальных протоколов получения терапевтически активных внеклеточных везикул (ВВ) культивированных мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (МСК) из их кондиционированной среды. При этом важным этапом является подбор и стандартизация условий культивирования клеток с целью получения большого количества ВВ за минимальное количество раундов пассирования без потери биологических свойств ВВ. В связи с этим целью данной работы явилось оценить влияние посевной дозы МСК и времени их культивирования в питательной ростовой среде на способность к продукции клетками ВВ.

Культуру МСК жировой ткани (ЖТ) (CD29+/CD44+/CD73+/CD90+/CD105+/CD34-/CD45-/HLADR-) человека культивировали по стандартной методике (37 °С, 5% CO₂, 100% влажность, α -MEM, 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 2 мМ глутамина, 1% смеси антибиотиков-антимикотиков) до 2-го пассажа. После этого клетки пассировали в различных посевных дозах, которые вызывали на следующий день формирование клеточного монослоя с конфлюентностью порядка 50%, 80% и 100%. МСК переводили на ростовую среду того же состава, но с добавлением 10% обедненной по экзосомам ФБС и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч, после чего полученную кондиционированную среду собирали и подвергали процессингу с использованием подхода дифференциального центрифугирования с этапом ультрацентрифугирования. Количество и подлинность (экспрессия CD9, CD63, CD81) полученных ВВ оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии.

В результате было выявлено, что наиболее оптимальной с точки зрения получения большого количества ВВ МСК ЖТ из их кондиционированной среды является посевная доза клеток, при которой за сутки после пассирования формируется клеточный монослой с конфлюентностью порядка 80%. В этом случае выход ВВ за 72 ч культивирования МСК ЖТ 3-го пассажа составляет на 40% и 20% больше, по сравнению с таковым для клеток, посаженных с исходной плотностью монослоя 50% и 100%, соответственно. Это можно объяснить тем, что при 70–80% конфлюентности монослоя клетки, находясь в логарифмической фазе роста, максимально функционально активны и при культивировании продуцируют в среду роста наибольшее количество ВВ. Кроме того было показано, что оптимальное время культивирования МСК ЖТ в плотности клеточного монослоя 80% для максимального выхода ВВ является период в 48 ч. При 24-х часовом культивировании продукция ВВ клетками была в 1,4 раза меньше, а при 72-х – не увеличивалась, что скорее всего связано с формированием 100% клеточного монослоя и началом контактного торможения МСК ЖТ, что приводит к снижению их функциональной активности.

Таким образом, можно сделать вывод, что для получения ВВ МСК в большом количестве, важными параметрами для контроля являются посевная доза клеток при пассировании и интервал их инкубирования в ростовой питательной среде в стандартных для клеток условиях культивирования, что позволит оптимизировать протокол получения ВВ культивированных МСК ЖТ.