БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЛИЗАТА ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В СРЕДУ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.С. Сергеева [1,2], Я.Д. Шанский [1], И.К. Свиридова [1], В.А. Кирсанова [1], С.А. Ахмедова [1], Е.А. Кувшинова [1], И.С. Мейснер [2]

[1] Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, Россия
[2] Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Москва, Россия

Biological effects of platelet lysate added to cultural medium of human cells

N.S. Sergeeva [1,2], Y.D. Shanskiy [1], I.K. Sviridova [1], V.A. Kirsanova [1], S.A. Ahmedova [1], E.A. Kuvshinova [1], I.S. Meisner [2]
[1] P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute, Moscow, Russia
[2] N.I. Pirogov Russian Research Medical University, Moscow, Russia

Лизат тромбоцитов (ЛТ) человека, содержащий ряд биологически активных веществ, позиционируется как возможная замена фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при культивировании клеток, предназначенных для клеточной терапии и регенеративной медицины. Ранее нами были установлены принципиальные различия в биохимическом составе ЛТ и ЭТС. В данной работе показано, что концентрации эстрадиола, тестостерона и инсулина в ЛТ в несколько раз выше, чем в ЭТС. Уровни тромбоцитарного фактора роста (PDGF AA, AB), трансформирующего фактора роста-β1 и сосудистого эндотелиального фактора роста в ЛТ в 10–50 раз выше, чем в ЭТС; PDGF BB в ЛТ не выявлен, а концентрации инсулиноподобного фактора роста-1 в ЛТ и ЭТС сходны. ЛТ поддерживает in vitro пролиферацию иммортализованных фибробластов кожи человека (ФЧ), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани человека и эпидермоидной карциномы гортани HEp-2. Время удвоения культур ФЧ и ММСК в присутствии ЛТ (10%) по сравнению с ЭТС (10%) снижается в 1,5–2,0 раза. ЛТ в отличие от ЭТС не поддерживает пролиферацию 3 из 4 культур человеческих опухолевых клеток: аденокарциномы молочной железы MCF-7, карциномы легкого линий A-549 и AOT-75. ЛТ, как и ЭТС, не препятствует индукции остеогенной и адипогенной дифференцировки ММСК in vitro, сохраняя, таким образом, их пластичность. После термоинактивации (56°С, 1 ч) способность стимулировать пролиферацию у ЛТ исчезает, а у ЭТС – сохраняется. Обсуждаются возможные причины различий в эффектах ЛТ и ЭТС как ростовых добавок к среде культивирования.

Ключевые слова: лизат тромбоцитов, фетальная телячья сыворотка, факторы роста, иммортализованные фибробласты кожи, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, опухолевые клетки.

Human platelet lysate (PL) contains a number of biologically active substances and viewed as possible fetal bovine serum (FBS) substitute in cell cultivation for cell therapy and regenerative medicine. Previously principle differences of FBS and PL biochemical composition were found. It was shown in this work that concentrations of estradiol, thestosterone and insulin were higher in PL comparing to FBS. Levels of platelet derived growth factor (PDGF AA, AB), transforming growth factor-β1 and vascular endothelial growth factor in PL were 10–50-fold larger comparing to FBS. PDGF BB was not determined in PL. Concentrations of insulin-like growth factor-1 in PL and FBS were about equaled. PL supported in vitro proliferation of human fibroblasts (HF), multipotential mesenchymal stromal cells (MMSC) of human adipose tissue and epidermoid larynx carcinoma HEp-2. HF and MMSC cultures doubling time in presence of PL (10%) vs FBS (10%) decreased 1.5–2.0-fold. PL unlike FBS did not support proliferation of 3 (amongst 4) human tumor cells cultures: breast adenocarcinoma MCF-7, lung carcinoma A-549 and AOT-75. PL (as FBS) did not prevent osteogenic/adipogenic differentiation induction of MMSC in vitro, keeping their plasticity. After thermoinactivation (56°C, 1 hour) the proliferation stimulating ability is retaining for FBS and disappearing for PL. Various causes of growth supplements (PL and FBS) effects differences are discussed.

Key words: platelet lysate, fetal bovine serum, growth factors, immortalized dermal fibroblasts, multipotential mesenchymal stromal cells, tumor cells.

Одной из актуальных проблем регенеративной медицины является обеспечение безопасности клеточных и тканеинженерных продуктов. Одним из ключевых аспектов ее обеспечения является использование для клеточного процессинга реактивов и вспомогательных компонентов, не оказывающих негативного влияние на клетки. Традиционно в качестве ростовой добавки для культивирования клеток используют фетальную телячью сыворотку (ФТС), которая считается комплексной смесью высоко- и низкомолекулярных биомолекул с физиологическим балансом стимулирующих и блокирующих факторов роста (ФР), с низким содержанием γ-глобулинов – ингибиторов роста и пролиферации клеток [1–4]. Однако использование ФТС, как источника ксеногенных протеинов, на этапах приготовления клеточных препаратов и тканеинженерных медицинских изделий, предназначенных для введения человеку, в настоящее время не рекомендуется из-за возможности индукции аллергических реакций, а также переноса в организм человека вирусов, прионов и зоонозов [3–6]. Возможная экспрессия главного комплекса гистосовместимости II типа (MHC II) в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (ММСК) в присутствии ФТС, по мнению ряда авторов, также ограничивает ее использование в технологиях регенеративной медицины [2, 7]. Не исключено, что генетическая нестабильность ММСК ряда доноров in vitro тоже может быть индуцирована компонентами ФТС [7].

На этапах разработки гуманизированных ростовых добавок к культуральным средам были апробированы экстракты многих тканей, биологические жидкости и бессывороточные среды с рекомбинантными

e-mail: prognoz.06@mail.ru

ФР, однако удовлетворительные результаты получены не были [8, 9].

Далее внимание исследователей было перенесено на тромбоциты, как один из основных источников ФР в организме: тромбоцитарного фактора роста (PDGF-AA, AB, BB); трансформирующего фактора роста (TGFα1, β); фактора роста гепатоцитов (HGF); инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1); сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF); эпидермального фактора роста (EGF); основного фактора роста фибробластов (FGFb) — и, в частности, на лизат тромбоцитов (ЛТ) человека как замену ФТС [2–4, 5, 7, 9–12]. В ЛТ был идентифицирован и ряд биологически активных веществ, отсутствующих в ФТС, в частности, ингибитор ангиогенеза PF4, фактор стромальных клеток-1 (SDF-1), ответственный за миграцию и хоуминг [5], тромбоспондин, Р-селектин, ингибитор урокиназы эндостатин, ряд интегринов [1, 2, 7, 13], которые также являются эффекторами для стволовых и прогениторных клеток. Однако, вклад этих факторов в активацию и супрессию внутриклеточного сигналинга не исследован.

Использование ЛТ человека в качестве ростовой добавки при культивировании клеток показало, что ЛТ поддерживает пролиферацию ММСК, предшественников кератиноцитов [7, 14–16], сохраняет пластичность ММСК in vitro [17], обеспечивает геномную стабильность ММСК in vitro при длительном культивировании, являясь протектором хромосомных аберраций [5, 17]. Однако, влияние ЛТ по сравнению с ФТС на культуры опухолевых клеток практически не изучено.

Цель работы: сравнение состава и влияния ЛТ и ФТС на рост нормальных, иммортализованных и опухолевых клеток человека in vitro, а также на пластичность ММСК.

Материал и методы

Получение ЛТ из тромбоцитарной массы

Материалом для получения ЛТ являлась тромбоцитарная масса 46 доноров (27 мужского и 19 — женского пола), полученная в отделении переливания крови ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России после подписания донорами добровольного информированного согласия. Средний возраст доноров составлял 33 года (мужчин — 31 год, женщин — 35 лет).

Тромбоцитарную массу от каждого донора получали путем афереза на аппарате Amicus (США) по методике фирмы-производителя прибора. Процедура заготовки тромбоцитарной массы валидирована и предполагает контаминацию лейкоцитами в количестве не более 1×10^6 на дозу при количестве тромбоцитов 200×10^9, что контролируется в соответствии с техническим регламентом о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии [18]. После завершения процедуры в лабораторию передавали стерильные запаянные пробирки-пробники объемом 6 мл (от каждого донора 1–2 пробника) с сопроводительной информацией: ФИО донора, пол, возраст, результаты клинического анализа крови, концентрация тромбоцитов в тромбоцитарной массе. Перед этапом получения ЛТ производили нормирование всех образцов тромбоцитарной массы по концентрации тромбоцитов ($1{,}75\times10^9$ тромбоцитов/мл), для чего в стерильных условиях содержимое пробирок-пробников переносили в пластиковые пробирки объемом 15 мл (Corning, США), производили дополнительно подсчет концентрации тромбоцитов в образце по унифицированной методике [19] и при необходимости центрифугировали тромбоцитарную массу при 4000 об/мин в течение 40 мин (центрифуга Eppendorf, Германия). Затем осадок тромбоцитов ресуспендировали в нужном для достижения указанной концентрации объеме супернатанта. Для получения ЛТ использовали, таким образом, неактивированные тромбоциты. ЛТ получали методом температурного лизиса, который заключается в проведении циклов замораживания и быстрого размораживания образца тромбоцитарной массы [3, 4]. Согласно данным ряда авторов, в результате такой процедуры происходит разрушение α-гранул тромбоцитов и высвобождение из них факторов роста [3, 4, 10, 17]. Для получения образца ЛТ пробирки с тромбоцитарной массой каждого донора замораживали при -80°С и через 24 ч размораживали при +37°С. Процедуру повторяли трижды. Затем образцы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 40 мин. (центрифуга Eppendorf, Германия) для осаждения фрагментов тромбоцитов. Объединенные супернатанты от 1–2 пробников каждого донора, представляющие собой ЛТ, оценивали под микроскопом при увеличении ×20 на наличие или отсутствие видимых нелизированных тромбоцитов и(или) их фрагментов. При отрицательном микроскопическом контроле ЛТ разливали в стерильные пластиковые микроцентрифужные пробирки (Corning, США) в зависимости от задач эксперимента по аликвотам от 100 до 500 мкл и замораживали (-80°С) до дальнейшего исследования.

Определение содержания гормонов и факторов роста в ЛТ и ФТС

Концентрации инсулина, эстрадиола и тестостерона были оценены в ЛТ из тромбоцитарных масс 20 из 46 доноров и в 4 образцах ФТС (HyClone, США, лоты № ARJ27433, № ARC25945; PAA, Австрия, серии № 1363, № 2946,) иммуноферментным методом.

Содержание факторов роста в 46 образцах ЛТ доноров и 4 образцах ФТС определяли методом твердофазового иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов Invitrogen (TGF-β1, VEGF), Quantikine BD Bioscience (PDGF AA, PDGF AB, PDGF BB) и IDS (IGF-1).

Оценка влияния ЛТ и ФТС на рост клеток in vitro

В работе использованы культуры иммортализованных фибробластов кожи человека (ФЧ), (предоставлены ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН»), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (ММСК) 2–3 пассажа (предоставлены ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена»), а также опухолевых клеток человека: аденокарциномы молочной железы MCF-7; эпидермоидной карциномы гортани HEp-2, карциномы легкого линий A-549 и AOT-75 (предоставлены банком клеточных культур ФГБУ «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» РАМН). ММСК выделяли из жировой ткани пациентов сочетанием механического и ферментативного дезагре-

гирования [20]. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие.

ФЧ и опухолевые клетки культивировали в полной ростовой среде следующего состава: среда DMEM (ПанЭко, Россия), глутамин (0,65 мг/мл, ПанЭко, Россия), Hepes-буфер (20 мМ, ПанЭко, Россия), гепарин (2 ед./мл, ФГУП «Московский эндокринный завод»). В качестве добавки к ростовой среде использовали пулированный образец 10% ЛТ (из тромбоцитарной массы 5 женщин и 5 мужчин) или 10% ФТС (PAA, Австрия; лот № A10106-0671). Для культивирования ММСК вместо DMEM использовали DMEM/F12 (ПанЭко, Россия).

Эксперименты in vitro по оценке динамики роста культур с использованием ЛТ и ФТС в качестве ростовых добавок к среде культивирования осуществляли в 96-луночных планшетах (Corning, США) с плотностью посева 5×10^3 кл. в лунке и со сменой культуральной среды дважды в неделю.

На сроках культивирования 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сут. определяли количество жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста, который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(-4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (MTT, Sigma, США) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде [21]. Для проведения МТТ-теста по окончании определенного срока культивирования из каждой лунки отбирали по 100 мкл среды и вносили по 25 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Через 3 ч инкубации (5% CO_2, 37°С) из каждой лунки полностью удаляли среду и производили растворение образовавшегося формазана с помощью изопропилового спирта (200 мкл/лунку). От осадка, образующегося в результате преципитации белков в изопропаноле, освобождались центрифугированием плат в течение 10 мин при 3000 об./мин (Jouan, Франция). Далее из каждой лунки переносили по 100 мкл супернатанта в 96-луночный планшет (Costar, США) и оценивали оптическую плотность раствора формазана на мультискане FC (Thermo scientific, США) при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали культуральную среду без клеток.

На основании результатов МТТ-теста рассчитывали величину прироста популяции клеток (Δ) в процентах в конкретный срок наблюдения по формуле:

$$\Delta = \frac{OD_{\text{наст}} - OD_{\text{предыд}}}{OD_{\text{предыд}}} \times 100\%,$$

где $OD_{\text{наст.}}$ — оптическая плотность раствора формазана в условных единицах в конкретный срок эксперимента; $OD_{\text{пред.}}$ — оптическая плотность раствора формазана в предыдущий срок эксперимента.

Для определения времени удвоения культур клеток при использовании ЛТ и ФТС в качестве добавок к среде культивирования клетки высевали во флаконы площадью 25 см² (Corning, США) с плотностью посева 5×10^3 кл/см² для культур ФЧ и ММСК и 15×10^3 кл/см² — для MCF-7. По достижении культурами состояния субконфлюэнтного монослоя (ФЧ и ММСК — 5 сут., MCF-7 — 9 сут.) клетки снимали с помощью раствора трипсин/версена (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1 (время инкубации — 2–3 мин, 37°С) и подсчитывали в камере Горяева. Время удвоения клеточных культур рассчитывали по формуле:

$$DT = \frac{t \times \ln(2)}{\ln(Y) - \ln(X)},$$

где DT — время удвоения (duplication time), ч; t — время между пассажами, ч; X и Y — количество посаженных и снятых клеток, соответственно.

Все пробы на всех этапах культивирования ставили в триплетах, используя при представлении результатов средние значения.

На всех контрольных точках исследования (1, 3, 5, 7, 10 и 14 сут.) проводили визуальный контроль морфологии культур клеток с помощью световой и фазово-контрастной микроскопии (Zeiss Axiovert 40C, Германия) с окрашиванием клеток гематоксилином и эозином по общепринятой методике.

Оценка дифференцировочных потенций ММСК человека in vitro

Состав сред для индукции остеогенной и адипогенной дифференцировки ММСК был описан нами ранее [20]. ММСК культивировали с остеогенными или адипогенными индукторами до 28 сут. и с помощью коммерческих наборов осуществляли окрашивание клеток на щелочную фосфатазу (маркер остеогенной дифференцировки) и липидные включения (маркер адипогенной дифференцировки.

Проведение термоинактивации ЛТ и ФТС

Одним из приемов для выявления различий в действующих компонентах в сложных биологических «коктейлях» является сравнение их термочувствительности. Известно, что нагревание ФТС (для инактивации ряда цитотоксических молекул, в частности, относящихся к системе комплемента) не влияет на ее способность стимулировать пролиферацию клеток in vitro. Поскольку в нашей работе ЛТ, как ростовая добавка, сравнивалась с ФТС, мы проводили инактивацию пулированного образца ЛТ и ФТС в термостатируемой водяной бане (Jouan, Франция) при 56°С в течение 1 ч. Для равномерного прогрева содержимое флаконов перемешивали каждые 5 мин.

Статистический анализ

Обработку полученных результатов проводили с применением стандартных методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрических методов (U-критерий Манна — Уитни, критерий Вилкоксона) при уровне статистической значимости различий $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что в ЛТ, как и в ФТС, содержатся все исследованные компоненты венозной крови человека [15]. Вместе с тем, в ряде случаев их уровень существенно и статистически значимо различался. Концентрации показателей формирования костной ткани — щелочной фосфатазы, ЛДГ, а также креатинина и ионов калия, кальция, магния, фосфора, железа в ЛТ были достоверно ниже, чем в ФТС. Концентрации холестерина, ЛПВП, общего белка, альбумина и одного из продуктов белкового обмена — мочевой кислоты — в ЛТ были выше, чем в ФТС.

В настоящей работы мы определяли уровни гормонов и содержание факторов роста в ЛТ и ФТС. Было обнаружено, что уровни гормонов в ЛТ и ФТС существенно различаются (табл. 1). Так, уровень инсулина в ЛТ, как мужчин, так и женщин, был более чем в 2 раза выше, чем в ФТС; уровень эстрадиола в ЛТ у мужчин был сходен с таковым в ФТС, а у женщин — достоверно выше, чем в ФТС: уровень тестостерона в ЛТ даже у женщин был в несколько раз выше, чем в ФТС (табл. 1). Таким образом, концентрации этих трех гормонов в ЛТ были статистически значимо выше, чем в ФТС.

Также достоверно и значительно выше (на 1–2 порядка) было содержание 4 из 6 изученных ФР в ЛТ по сравнению с ФТС. Только уровни IGF-1 в ЛТ и ФТС оказались сходными, а PDGF-BB при использованном пределе чувствительности метода в ФТС выявлен не был (табл. 2).

Более высокая концентрация ФР и гормонов в ЛТ давало основание надеяться, что при культивировании клеток его можно будет использовать в меньших количествах, чем ФТС, если считать, что стимулирующий эффект ЛТ, как ростовой добавки, на пролиферацию клеточных культур действительно связан с этими биологически активными веществами.

В этой связи, в ходе второго этапа исследования была проведена оценка влияния ЛТ и ФТС как культуральных добавок на рост клеток in vitro. Было изучено влияние ЛТ и ФТС в разных соотношениях в составе ростовой среды на экспансию ММСК in vitro в традиционно используемом количестве (10%) и установлено, что с увеличением содержания ЛТ в культуральной среде прирост популяции ММСК возрастал (рис. 1).

Таблица 1. **Уровни некоторых гормонов в ЛТ и ФТС**

	Инсулин (мкЕД/мл)	Эстрадиол (пмоль/л)	Тестостерон (нмоль/л)
ЛТ (женщины, n = 9)	2,4±0,4*	349,0±68,1*	1,25±0,19*
ЛТ (мужчины, n = 11)	2,0±0,4*	106,0±16,5	12,8±1,5*
ФТС (n = 4)	0,72±0,26	151,7±2,9	0,45±0,0

* — различия при сравнении с ФТС статистически значимы, $p<0,05$.

Таблица 2. **Содержание факторов роста в образцах ЛТ и ФТС**

		ЛТ человека (n = 46)	ФТС (n = 4)
PDGF, пг/мл	AA	6908±673*	227,0±23,2
	AB	3984±487*	42,9±12,32
	BB	8196±979	0
IGF-1, нг/мл		108,7±4,5*	102,6±5,3
TGF-β1, пг/мл		16303±1004,8*	1352,0±106,4
VEGF, пг/мл		147,7±19,8*	4,0±2,4

* — различия при сравнении с ФТС статистически значимы, $p<0,05$.

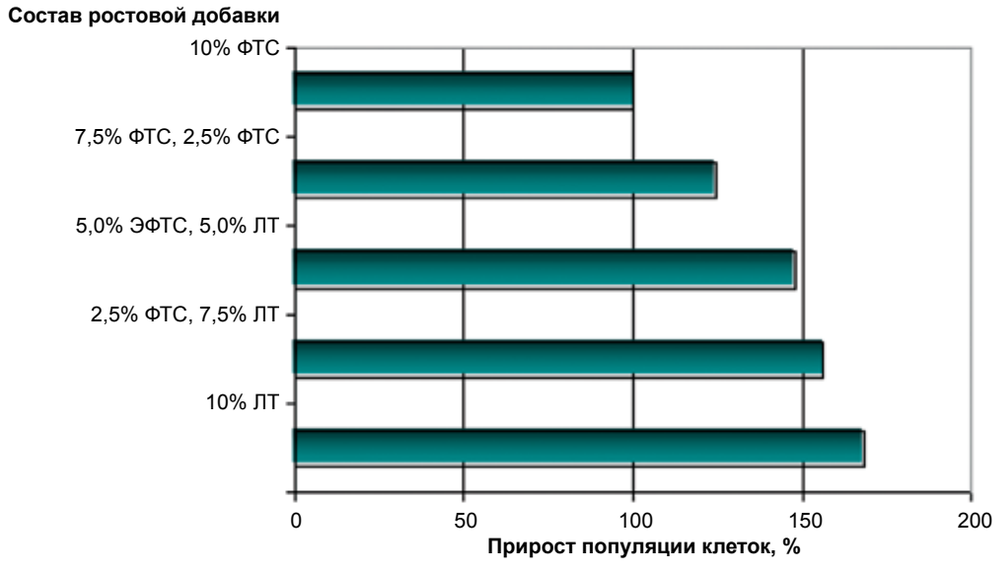
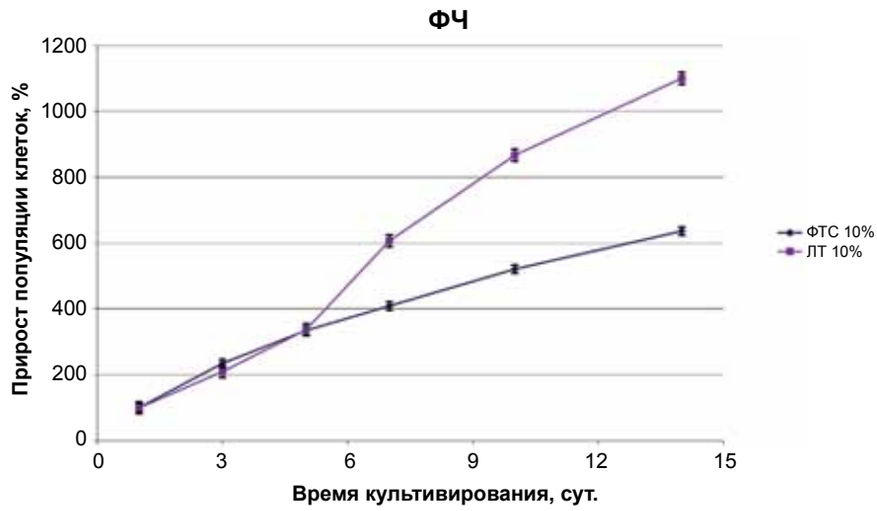


Рис. 1. Прирост ММСК человека в средах с разным соотношением ФТС и ЛТ. МТТ-тест, 5 сут. культивирования

При оценке динамики роста нормальных и иммортализованных культур в среде с 10% ЛТ или ФТС было показано более выраженное стимулирующее влияние ЛТ, по сравнению с ФТС, на динамику роста как ММСК, так и ФЧ (рис. 2). В то же время, следует признать, что небольшое преимущество в скорости прироста популяции ФЧ или ММСК в присутствии ЛТ вместо ФТС трудно объяснить только наличием в ЛТ факторов роста, т.к. их концентрации в ЛТ существенно превосходят таковые в ФТС. Не исключено также, что зависимость доза-эффект для ЛТ в отношении влияния на скорость пролиферации клеток не линейна. Для проверки этого предположения целесообразно исследовать влияние ЛТ на пролиферацию ФЧ и ММСК в диапазоне существенно меньших концентраций, чем используется ФТС.

Иные результаты были получены при сравнении эффекта ЛТ и ФТС как ростовых добавок на динамику экспансии 4 культур опухолевых клеток (рис. 3): ЛТ, в отличие от ФТС, не поддерживал пролиферацию 3 из них (MCF-7, A-549, AOT-75) на всех сроках культивирования и слабо стимулировал пролиферацию HEp-2.

Рассчитанное время удвоения клеточных культур в присутствии ЛТ по сравнению с ФТС, подтверждает представленные выше данные: показатель достоверно уменьшался как в случае иммортализованных ФЧ, так и ММСК, но увеличивался для опухолевых клеток MCF-7 (табл. 3).



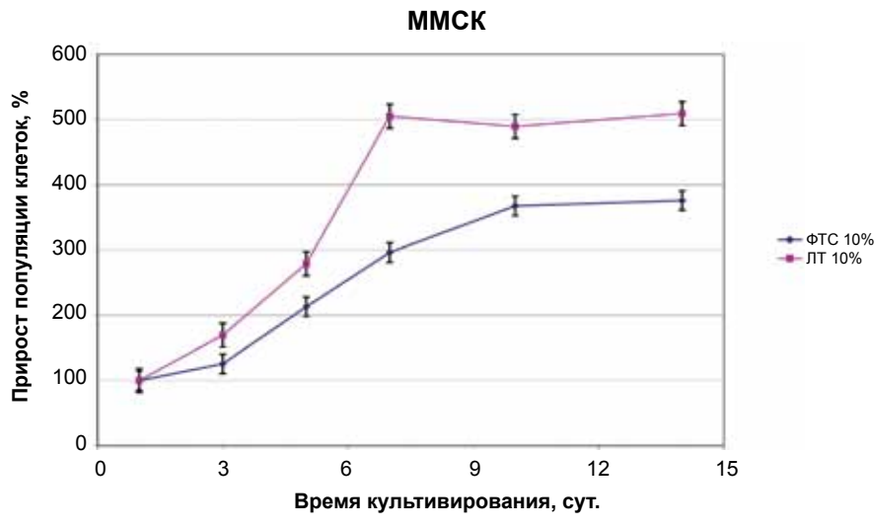


Рис. 2. Динамика прироста популяции ФЧ и ММСК в культуральной среде, содержащей ЛТ или ФТС

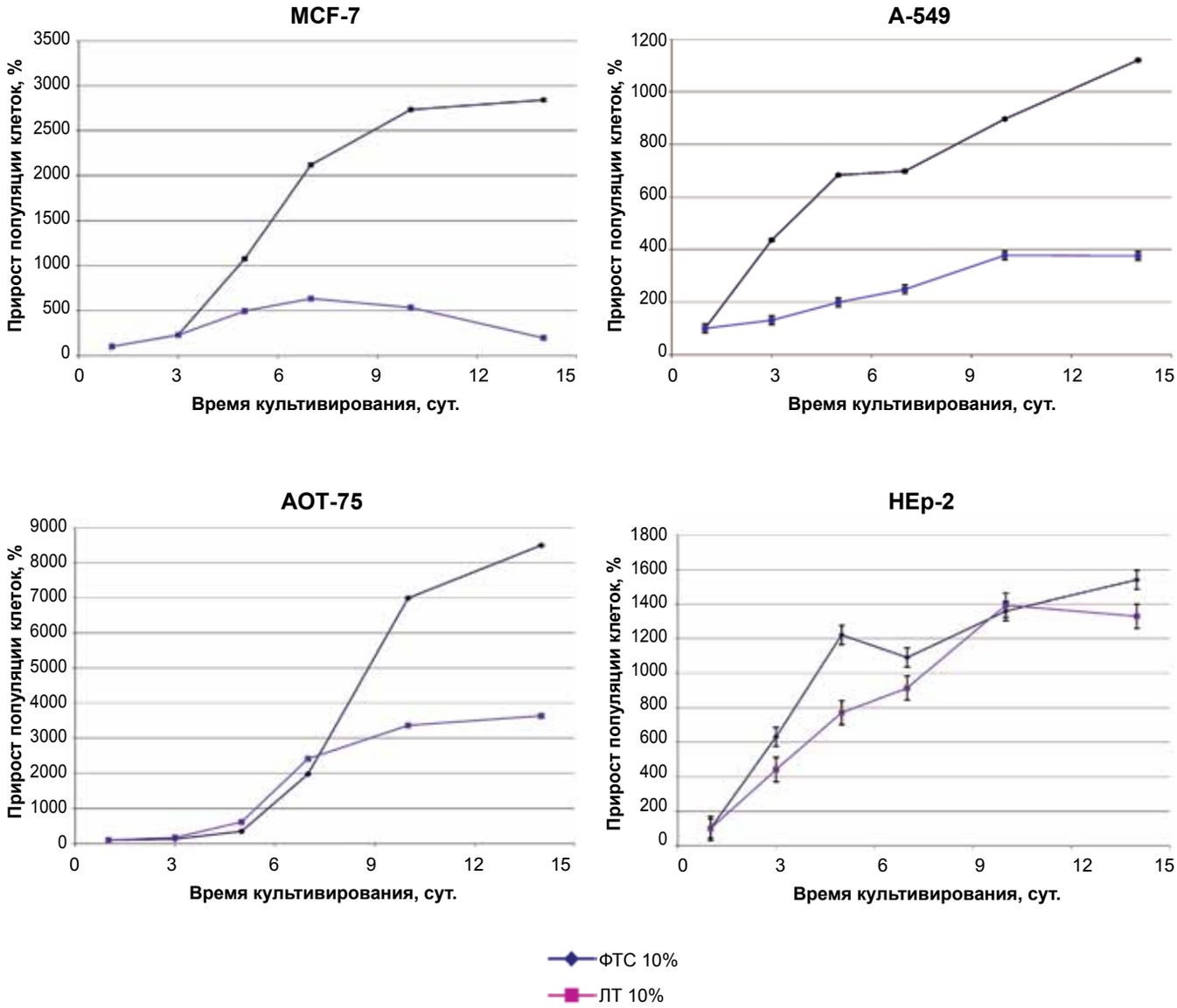


Рис. 3. Динамика экспансии опухолевых клеток человека в культуральной среде, содержащей ЛТ или ФТС

Таблица 3. **Время удвоения культур клеток при использовании разных ростовых добавок**

Культура клеток	Ростовая добавка (10%)	Время удвоения культуры, ч
ФЧ	ФТС	61,7±10,7
	ЛТ	46,3±2,6*
ММСК	ФТС	84,3±22,2
	ЛТ	43,4±4,4*
MCF-7	ФТС	80,4±12,7
	ЛТ	164,7±35,5*

* – различия при сравнении с ФТС статистически значимы, $p<0,05$.

Безусловно, для понимания того, насколько это является общей закономерностью, необходимо исследовать большее число разнообразных линий опухолевых клеток. Тем не менее, можно предположить несколько причин дифференцированного влияния ЛТ как ростовой добавки на пролиферацию нормальных, иммортализованных и опухолевых клеток in vitro. В частности, это может быть связано с отсутствием на опухолевых клетках соответствующих рецепторов к ФР или гормонам, с наличием в ЛТ здоровых лиц глобулиновой фракции белков, некоторые из которых оказывают блокирующее действие на опухолевые клетки, а также с высокой концентрацией в ЛТ TGF-β1, который способен блокировать пролиферацию опухолевых клеток через циклинзависимые киназы [2]. Не исключено и блокирующее влияние на опухолевые клетки других, не идентифицированных компонентов ЛТ доноров.

Таким образом, в ходе второго этапа исследования мы показали, что ЛТ в аспекте поддержания жизнеспособности и пролиферативной активности ММСК и ФЧ оказался даже более эффективным, чем ФТС, в то время как для экспансии трех из четырех линий опухолевых клеток такого биологического действия ЛТ выявлено не было.

На третьем этапе выполнялась сравнительная оценка влияния ЛТ и ФТС на дифференцировочные потенции ММСК. Было показано, что культивирование этих клеток в среде с добавлением 10% ЛТ сохраняет их способность к индуцируемой (соответствующими факторами) остео- и адипогенной дифференцировке (рис. 4, 5).

Для того, чтобы определить, связано ли биологическое действие ЛТ на ММСК и ФЧ (поддержка жизнеспособности и пролиферативной активности) с наличием в его составе исследованных факторов роста мы предприняли эксперимент с термоинактивацией ЛТ и ФТС при 56°С в течение 1 ч. Было выявлено, что после термоинактивации способность к стимулировать пролиферацию нормальных и иммортализованных клеток у ЛТ исчезла, а у ФТС — сохранилась (рис. 6). Эти данные с определенной долей допущения свидетельствуют, что выявленный биологический эффект ЛТ на ММСК и ФЧ обусловлен активностью факторов роста, в то время как действие ФТС, вероятно, обеспечивается и другими, более термоустойчивыми компонентами.

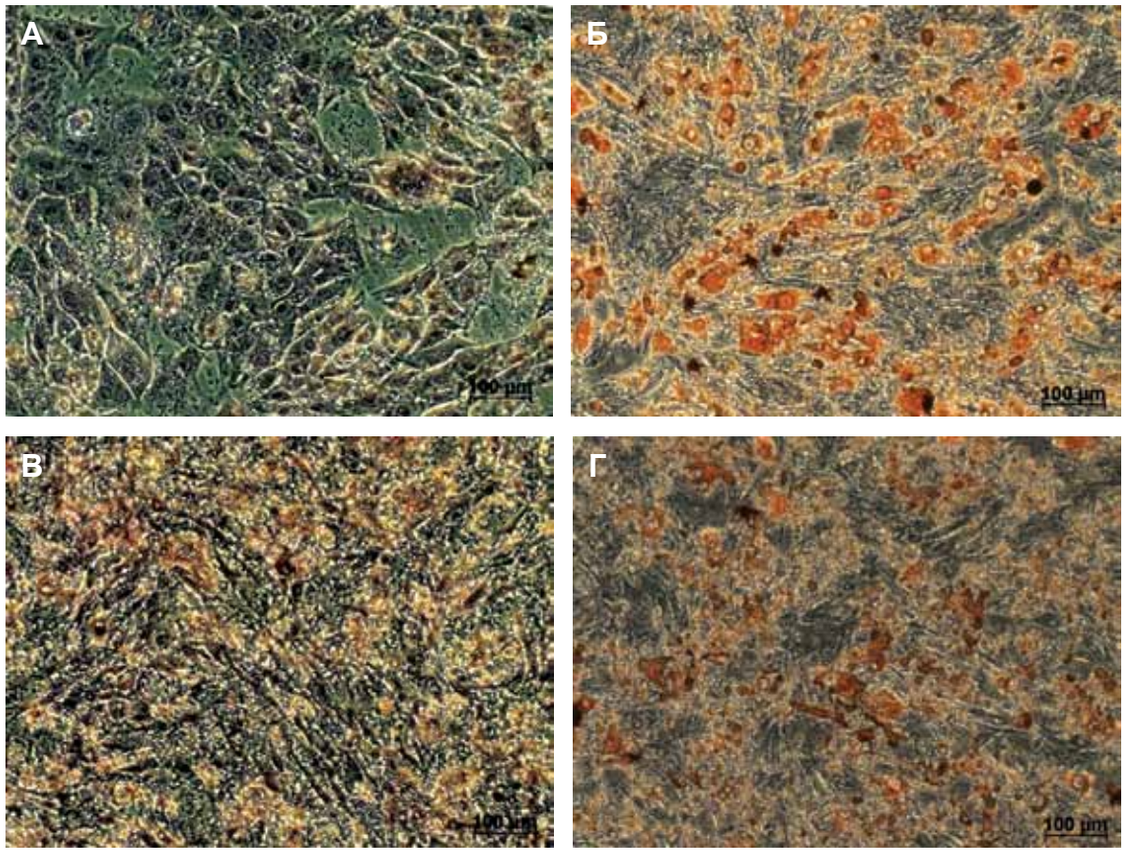


Рис. 4. Культуры ММСК на разных сроках культивирования в адипогенной среде с ростовыми добавками:
А, Б — 10% ФТС; В, Г — 10% ЛТ.
А, В — 8 сут, Б, Г — 19 сут. культивирования.
Цитохимическая реакция по определению липидных включений

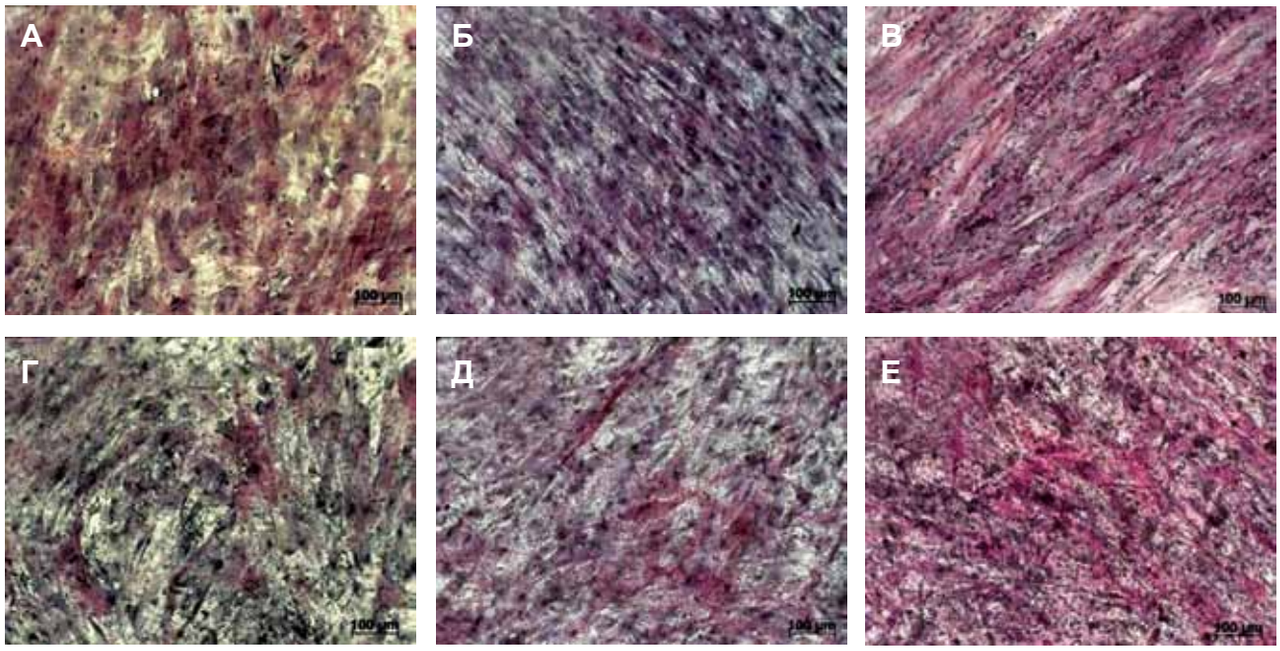


Рис. 5. Культуры ММСК на разных сроках культивирования в остеогенной среде с ростовыми добавками: А–В – 10% ФТС; Г–Е – 10% ЛТ; А, Г – 8 сут., Б, Д – 15 сут.; В, Е – 21 сут. культивирования

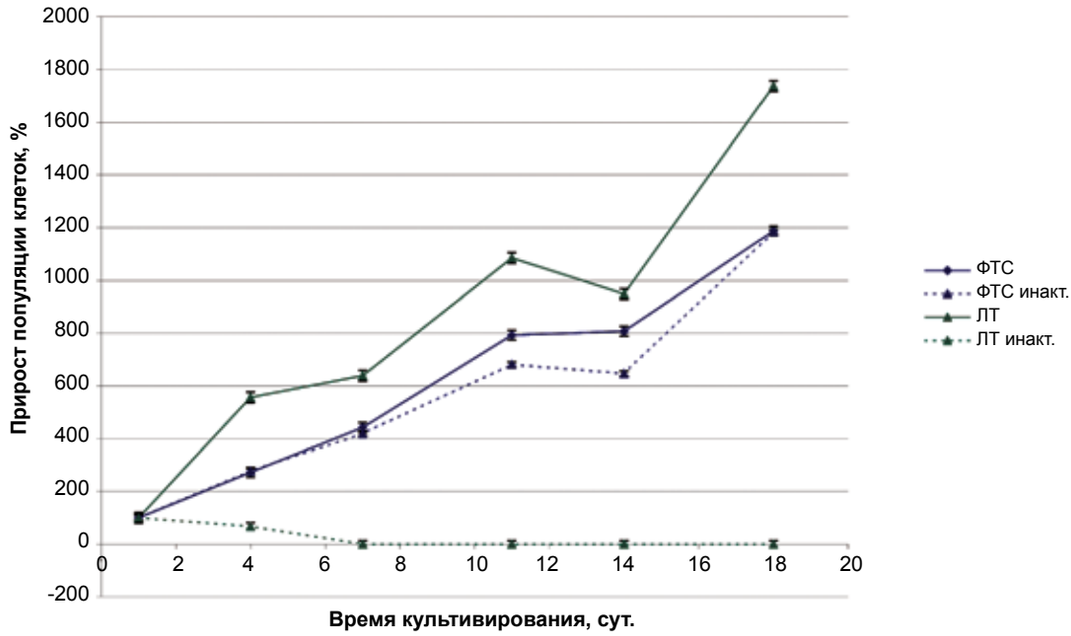


Рис. 6. Динамика прироста популяции ФЧ при культивировании в средах с использованием инактивированных и неинактивированных образцов ФТС (10%) и ЛТ (5%)

Заключение

Таким образом, по формальным признакам ЛТ может стать полноценной аллогенной добавкой к ростовой среде для культивирования нормальных, в т.ч. стволовых клеток человека. В то же время полученные данные позволяют предположить, что принципиально разные ансамбли биологически активных молекул в ЛТ и ФТС отвечают за поддержку жизнеспособности и пролиферации клеток in vitro. Разделяя мнение ряда исследователей о необходимости выявить весь спектр биологически активных веществ тромбоцитов [14], а также опираясь на полученные данные о различном влиянии ЛТ на ФЧ и ММСК, с одной стороны, и опухолевые клетки – с другой, а также разной термочувствительности ЛТ и ФТС как ростовых добавок, мы предполагаем, что дальнейшие детальные исследования состава ЛТ, его термолабильности в сопоставлении с рецепторным статусом нормальных, иммортализованных и опухолевых клеток позволят идентифицировать факторы, сочетание которых будет поддерживать пролиферацию и дифференцировку нормальных и не поддерживать пролиферацию опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Marx R. Plateler-rich plasma: evidence to support its use. J. Oral Maxillofac. Surg. 2004; 62(4): 489–96.

2. Rauch C., Feifel E., Amann E.-M et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysate as a serum substitute in cell culture media. ALTEX 2011; (25): 305–16.

3. Mojica-Henshaw M.P., Jacobson P., Morris J. et al. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. Cytotherapy 2013; 15: 1458–68.

4. Azouna N.B., Jenhani F., Regaya Z. et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res. Ther. 2012; (3): 6.

5. Lange C., Cakiroglu F., Spiess A.-N. et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. J. Cell. Phys. 2007; 213: 18–26.

6. Sankaranarayanan K., Renny C.M., Raghavan U. et al. Humanised substitutes for animal sera in human mesenchymal stem cell culture and differentiation. Cell Biol. 2011 Apr. 15. Epub ahead of print.

7. Crespo-Diaz R., Behfar A., Butler G.W. et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. Cell Transpl. 2011; (20): 797–811.

8. Pazos P., Boveri M., Gennari A. et al. Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin. ALTEX 2004; (21): 67–72.

9. Filipic B., Shehata M., Toth S. et al. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. ALTEX 2002; (19): 15–20.

10. Naaijkens B.A., Niessen H.W., Prins H.-J. et al. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. Cell Tiss. Res. 2012; 348(1): 119–30.

11. Killian O., Flesch I., Wenisch S. et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. Eur. J. Med. Res. 2004; (9): 337–44.

12. El Backly R., Ulivi V., Tonachini L. et al. Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratynocytes associated with a strong proinflammatory response. Tissue Eng. Part A. 2011; 17(13-14): 1787–800.

13. Peterson J.E., Zurakowski D., Italiano J.E. et al. VEGF, PF4, and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. Angiogenesis 2012; (15): 265-73.

14. Mishra A., Tummala P., King A. et al. Buffered platelet-rich plasma enchances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. Tissue Eng. C. 2009; 15(3): 431–5.

15. Шанский Я. Д., Сергеева Н.С., Свиридова И.К. и др. Исследование лизата тромбоцитов человека как перспективной ростовой добавки для культивирования стволовых и других типов клеток. Клеточные технологии в биологии и медицине 2013; (3): 153–8.

16. Сергеева Н.С., Васильев А.В., Шанский Я.Д. и др. Некоторые биологические характеристики и эффекты лизата тромбоцитов доноров как ростовой добавки для безопасного культивирования клеток. В: Сборник тезисов докладов V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»; 18–21 ноября 2013 г., Москва, Россия. Москва: МАКС Пресс. 2013; С. 68.

17. Bernardo M.E., Avanzini A., Perotti C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. J. Cell. Phys. 2006; 211: 121–30.

18. Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Приложение к постановлению Правительства РФ от 26.01.2010 № 29.

19. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотникая Р.П. и др. В: В.В. Меньшиков, редактор. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987; 368 с.

20. Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А. и др. Культивирование и характеристика негемопоэтических стволовых клеток из жировой ткани человека. Молекулярная медицина 2006; (2): 23–9.

21. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983; 65: 55–63.

Поступила 14.02.2014