

## РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ СХЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Колтунова А.Ю. (Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилёва)

В докладе произведён тщательный анализ использования питательных сред различного состава с целью определения наиболее благоприятной для культивирования гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) питательной среды. Помимо этого, проведена сравнительная оценка выявленных преимуществ и недостатков двух методов подсчёта клеток: ручного, проведённого с помощью камеры Горяева, и автоматического, с использованием автоматического счётчика клеток.

**Введение.** В изучении ГСК произошёл невероятный прорыв: по запросу «hemopoietic stem cells» в базе данных «PubMed» на сегодняшний день опубликовано более 3000 научных статей, 42% которых были изданы за последние 10 лет. Доказано, что на процессы самоподдержания ГСК влияют не только внутриклеточные изменения и сигнальные пути, но и микроокружение ниши играет важную роль в регуляции процессов самообновления. Помимо детального изучения компонентов ниши и их влияния на активацию ГСК и процессы их старения, были представлены успешные разработки новых способов культивирования:

- *3D-культивирование* в специально сконструированных биофункциональных каркасах, искусственно создающих условия идентичные условиям ниши. Преимуществом использования скаффолда является увеличение получаемого количества ГСК, способных к восстановлению кроветворения в полном объёме. Высокая себестоимость и сложность конструирования представляют невозможность использования данного метода на постоянной основе в клинике.
- *2D-культуры.* Исследователями показано, что питательные среды для культивирования ГСК, имеющие в составе цитокины (тромбопоэтин, ИЛ-3, фактор стволовых клеток и др.), положительно влияют на пролиферацию клеток. Однако клетки быстро теряют мультипотентность и начинают дифференцироваться. Следовательно, данный способ культивирования не является приоритетным для клеточной терапии.
- *культивирование в биореакторах,* позволяющих увеличить объём культивируемых клеток и масштабировать и автоматизировать производство.

Дальнейшее исследование вопросов, связанных с созданием бюджетных методов культивирования ГСК, является необходимыми по причине того, что ГСК считается одними из наиболее перспективных видов клеток-кандидатов для трансплантации пациентам, страдающим аутоиммунными заболеваниями такими, как рассеянный склероз, красная волчанка, системная склеродермия. На данный момент этот вид терапии призван замедлить прогрессию заболеваний и улучшить состояние больных.

**Основная часть.** В ходе эксперимента было использовано 5 образцов костномозговой взвеси, из которых были выделены ГСК по протоколу, используемому в лаборатории «Центр клеточных технологий», АО «Национальный научный медицинский центр». Каждый образец костномозговой взвеси был предварительно разделён по 50 мл в 4 одноразовые пробирки. Для посева были использованы 4 вида универсальной модифицированной по способу Дульбекко питательной среды (DMEM). Основное различие заключалось в составе:

1. классическая среда DMEM;
2. среда с повышенным содержанием L-глутамин;
3. среда с добавлением янтарной кислоты;
4. питательная среда с добавлением фолиевой и янтарной кислот.

По итогам исследования наилучшие результаты (увеличение числа ГСК после культивирования в 140 раз) были получены при использовании питательной среды с добавлением янтарной кислоты. Ещё одним достоинством этого дополнительного компонента является его дешевизна (средняя стоимость 1г янтарной кислоты в Казахстане 116 тенге, что эквивалентно 0.27 долларов США).

До и после культивирования был произведён сравнительный подсчёт клеток каждого образца ГСК с применением классического ручного метода и автоматического счётчика клеток. По результатам анализа были сделаны следующие выводы:

1. Ручной метод занимает большее количество времени, что является большим недостатком при подсчёте клеток, окрашенных красителем трипановым синим. Также результат напрямую зависит от опыта сотрудника. Однако одним из плюсов данного метода является относительная экологичность и возможность многократного использования гемоцитометра.
2. Автоматический метод, безусловно, менее трудоёмкий и удобен при постоянном частом использовании. Тем не менее, для аппарата необходимо использовать специальные одноразовые пластиковые картриджи.

**Выводы.** В настоящий момент разработанная питательная среда используется для продолжения исследования на большей группе добровольцев-доноров КМ. Разработанная питательная среда предлагает более высокую скорость роста клеток, что является основным плюсом для её дальнейшего использования по причине того, что у большинства пациентов изначально выделенное количество ГСК очень мало. Помимо этого себестоимость среды практически не увеличилась, что, следовательно, не требует увеличения стоимости процедуры трансплантации для пациента.