

Использование аполипопротеина А-I в качестве компонента бессывороточной питательной среды для культивирования клеток костного мозга

А.Ю. Городецкая, Т.А. Ткаченко, А.Н. Дударев, И.О. Чешенко, И.Ф. Усынин

*НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Резюме

Важным этапом в производстве препаратов для клеточной терапии и тканевой инженерии является культивирование клеток *in vitro*. Цель данной работы – исследовать влияние человеческого аполипопротеина А-I (апо А-I) на функциональную активность культивируемых клеток костного мозга и показать возможность использования данного белка в качестве компонента бессывороточной питательной среды. **Материал и методы.** Клетки костного мозга культивировали в 24-луночных планшетах в среде RPMI-1640 в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. В качестве интегрального показателя жизнеспособности клеток в процессе культивирования определяли уровень биосинтеза белка и ДНК по скорости включения [¹⁴C]-лейцина и [³H]-тимидина в общий белок и ДНК соответственно. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что скорость биосинтеза ДНК в присутствии апо А-I была выше, чем в его отсутствие, на 55 % через 8 ч, на 523 % через 24 ч и на 219 % через 48 ч. В этих условиях также возростала скорость биосинтеза общего белка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие апо А-I в бессывороточной питательной среде сохраняет функциональную активность культивируемых клеток костного мозга. Учитывая, что регуляторный эффект апо А-I достигается при небольшой концентрации белка (15 мкг/мл), использование апо А-I, выделенного из сыворотки крови пациента, позволит получить практически безопасную питательную среду для культивирования аутологичных клеток костного мозга в целях персонализированной клеточной терапии и тканевой инженерии.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, культура клеток, клетки костного мозга, бессывороточная питательная среда, биосинтез ДНК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Городецкая А.Ю., e-mail: a.pe4enkina@yandex.ru

Для цитирования: Городецкая А.Ю., Ткаченко Т.А., Дударев А.Н., Чешенко И.О., Усынин И.Ф. Использование аполипопротеина А-I в качестве компонента бессывороточной питательной среды для культивирования клеток костного мозга. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (4): 20–27. doi: 10.15372/SSMJ20200403

The use of apolipoprotein A-I as a component of serum-free nutrient medium for bone marrow cell culture

A.Yu. Gorodetskaya, T.A. Tkachenko, A.N. Dudarev, I.O. Cheshenko, I.F. Usynin

*Institute of Biochemistry of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

Abstract

An important step in preparation of cells for cell therapy and tissue engineering is the cultivation of cells *in vitro*. The aim of this work is to study the effect of human apolipoprotein A-I (apoA-I) on the functional activity of cultured bone marrow cells and to show the possibility of using this protein instead of animal fetal serum. **Material and methods.** Bone marrow cells were cultured in 24-well plates in RPMI-1640 medium in a CO₂ incubator at a temperature of 37 °C. The rate of incorporation of [¹⁴C]-leucine into the total cell protein and [³H]-thymidine into the DNA was used as an integral indicator of cell viability during cultivation. **Results and discussion.** It was found that the rate of DNA synthesis in bone marrow cells in the presence of apo A-I increased compared with the control group (without apo A-I)

by 55 % after 8 hours, by 523 % after 24 hours and by 219 % after 48 hours. Under these conditions the rate of protein synthesis was also increased. The results indicate that the presence of apo A-I in serum-free culture medium preserves the functional activity of cultured bone marrow cells. Considering that the regulatory effect of apo A-I is achieved at a low protein concentration in the medium (15 µg/ml), isolation of apo A-I from the patient's own blood serum will provide a practically safe nutrient medium for culturing autologous bone marrow cells with applications in personalized cell therapy and tissue engineering.

Key words: apolipoprotein A-I, cell culture, bone marrow cells, serum-free culture medium, DNA synthesis.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Gorodetskaya A. Yu., e-mail: a.pe4enkina@yandex.ru

Citation: Gorodetskaya A. Yu., Tkachenko T.A., Dudarev A.N., Cheshenko I.O., Usynin I.F. The use of apolipoprotein A-I as a component of serum-free nutrient medium for bone marrow cell culture. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (4): 20–27. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200403

Введение

В настоящее время одним из перспективных направлений регенеративной медицины является трансплантация стволовых и дифференцированных соматических клеток с целью восстановления структуры и функции поврежденного органа или ткани. Наибольшим регенераторным потенциалом обладает костный мозг – основной источник стволовых и прогениторных клеток. Производство препаратов для клеточной терапии включает в себя культивирование клеток костного мозга *in vitro*, экспансию и селекцию разных типов клеток. Независимо от назначения клеточной культуры, ключевым фактором сохранения жизнеспособных и функционально активных клеток является состав питательной среды, компоненты которой не оказывают негативного влияния на культивируемые клетки и обеспечивают дальнейшее безопасное использование клеточных и тканеинженерных продуктов.

Для культивирования клеток человека и животных обычно используют питательные среды, содержащие 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). ЭТС содержит оптимальное соотношение факторов роста, гормонов и энергетических субстратов, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток *in vitro*. В то же время хорошо известно, что питательные среды для культивирования клеток человека не должны содержать ксеногенный материал, например эмбриональную сыворотку или альбумин животного происхождения, так как существует риск инфицирования культивируемых клеток вирусами и прионами животных с последующим их переносом в организм человека [1]. Кроме того, длительное культивирование в присутствии сывороток животных может изменять свойства клеток различного происхождения. Так, мезенхимные

клетки костного мозга, культивируемые в присутствии фетальной бычьей сыворотки, характеризуются нестабильностью транскриптома, включая изменение экспрессии генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, апоптоз и клеточную адгезию [2].

В настоящее время прилагаются большие усилия для создания бессывороточных сред с включением в их состав стимуляторов клеточного роста различной природы [3]. Ранее нами показано, что такими свойствами обладают плазматические липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и их белковый компонент – аполипопротеин А-I (апо А-I) [4]. Цель данной работы – исследовать влияние человеческого апо А-I на функциональную активность культивируемых клеток костного мозга и показать возможность использования данного белка в качестве компонента бессывороточной питательной среды.

Материал и методы

Исследования с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава Российской Федерации № 267 от 19.06.2003). Клетки получали из бедренной кости крыс линии Wistar стандартным методом [5]. Очистку костного мозга от эритроцитов и лейкоцитов проводили с помощью противотокового центрифугирования в элютриаторном роторе JE-5.0 центрифуги Avanti J-26XP (Beckman Coulter, США) при 2500 об/мин и скорости тока жидкости 14 мл/мин. Полученную суспензию клеток, содержащую не более 3 % эритроцитов и

5 % лимфоцитов, культивировали в 24-луночных планшетах ($1,5 \times 10^6$ клеток на 1 лунку) в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в CO_2 -инкубаторе (Cole Parmer, США) в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 и 95 % воздуха, при температуре 37 °С.

В работе использовали эмбриональную телячью сыворотку производства компании NuClone Laboratories (США), сыворотку крови половозрелых крыс линии Wistar и сыворотку человека, выделенную из крови здоровых доноров. Сыворотки термически обрабатывали при 56 °С в течение 30 мин для инактивации комплемента, центрифугировали для удаления агрегатов и стерилизовали с помощью фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм (Biofill). Сыворотки хранили в замороженном состоянии при температуре -20 °С.

ЛПВП выделяли из плазмы крови человека методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr [6] на центрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter) при 105000 g. ЛПВП делипидировали в неденатурирующих (без осаждения белка) условиях смесью бутанол-диизопропиловый эфир [7]. Очистку апо А-I проводили методом высаливания сульфатом аммония с последующей ренатурацией белка диализом против фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) [8]. Чистоту выделенного апо А-I проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэмли, используя набор белковых маркеров производства НПО «СибЭнзим» (Россия) (рис. 1). Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Для изучения проникновения в клетки изолированного белка использовали конъюгаты кол-

лоидного золота с апо А-I. Коллоидное золото с размером частиц 5 нм получали путем восстановления тетрахлорауровой кислоты $\text{HAuCl}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ цитратом натрия и таниновой кислотой [9]. Конъюгирование белка с коллоидным золотом проводили в 10 mM фосфатном буфере при рН 6,2. Минимальное количество белка, необходимое для стабилизации коллоида, определяли путем его титрования. От не связавшегося белка конъюгат очищали с помощью центрифугирования при 45 000 об/мин в течение одного часа.

Образцы препаратов для электронной микроскопии фиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида или 4%-м параформальдегиде в фосфатном буфере (рН 7,4) и дофиксировали 1%-м раствором OsO_4 в том же буфере. Материал обезжизивали и заливали в эпоксидную смолу по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на Ultratome III (ЛКВ, США), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония).

Скорость биосинтеза белка и ДНК в клетках костного мозга определяли по включению радиоактивно меченых предшественников [^{14}C]-лейцина (Чехия) в общий белок клеток и [^3H]-тимидина («Изотоп», Россия) в ДНК [10]. Для этого за 2 ч до окончания инкубации в культуральную среду вносили по 2,0 мкКи/мл меченого предшественника. После лизиса клеток материал наносили на фильтры, которые проходили многоэтапную отмывку от не связавшейся метки. Радиоактивность проб измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark II (Amersham, Великобритания). Скорость включения меченых предшественников оценивали в импульсах (имп) в 1 мин на 10^6 клеток или в процентах от контроля. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение от трех независимых экспериментов, выполненных в трех параллелях. Различия между выборками оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни.

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины «Спектрометрические измерения» (НИИ биохимии) и «Современные оптические системы» (НИИ экспериментальной и клинической медицины) (Новосибирск).

Результаты и их обсуждение

Цель данной работы – исследовать влияние человеческого апо А-I на функциональную активность культивируемых клеток костного мозга

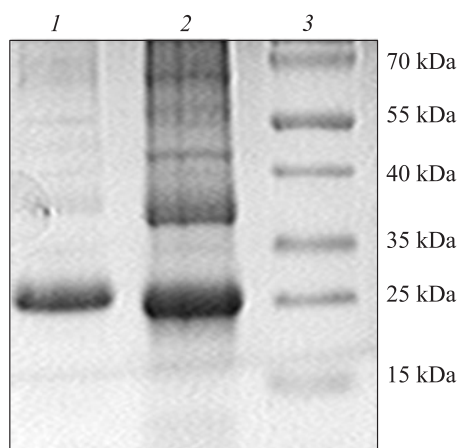


Рис. 1. Электрофореграмма суммарной фракции ЛПВП и апо А-I, выделенных из плазмы крови человека; 1 – апо А-I, 2 – ЛПВП, 3 – белки-стандарты

Fig. 1. Electrophoregram of the total fraction of high density lipoproteins and apo A-I isolated from human plasma; 1 – apo A-I, 2 – high density lipoproteins, 3 – standard proteins

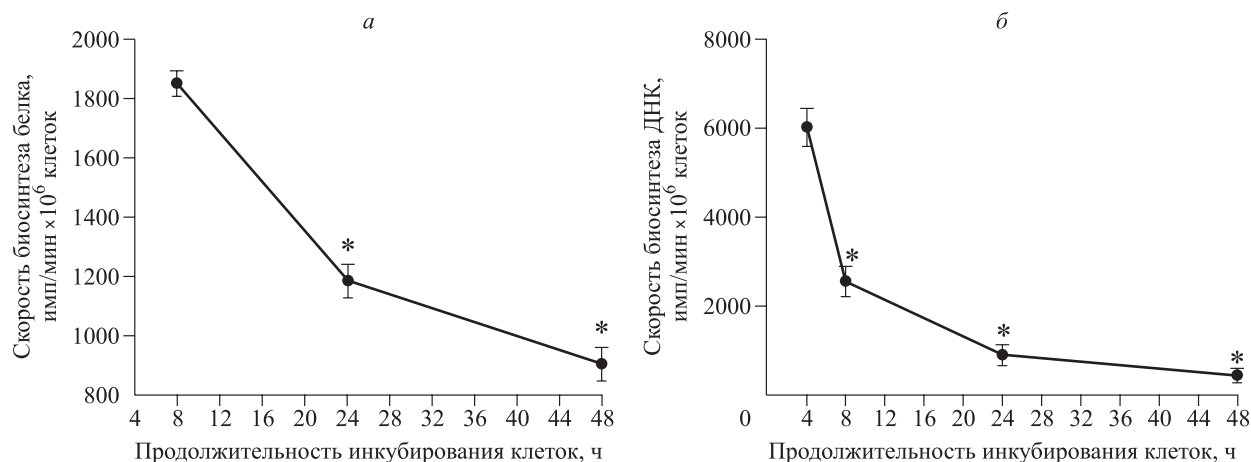


Рис. 2. Динамика скорости биосинтеза белка (а) и ДНК (б) в процессе культивирования клеток костного мозга в бессывороточной питательной среде RPMI-1640. Звездочкой (*) отмечены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от значений через 4 и 8 ч

Fig. 2. Dynamics of protein (a) and DNA (б) synthesis rate during culture of bone marrow cells in serum-free medium RPMI-1640. The horizontal axis indicates the duration of cell cultivation, the vertical axis shows the rate of incorporation of [¹⁴C]-leucine into protein (a, impulse/min per 10⁶ cells) or [³H]-thymidine into DNA (б, impulse/min per 10⁶ cells). An asterisk (*) indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from values after 4 and 8 hours

и показать возможность использования данного белка в качестве компонента бессывороточной питательной среды. Для оценки эффективности предлагаемого нами компонента питательной среды использовали культуру клеток костного мозга экспериментальных животных. В качестве интегрального показателя функциональной активности клеток в процессе культивирования определяли скорость включения радиоактивно меченых предшественников ¹⁴C-лейцина в общий белок клеток и [³H]-тимидина в ДНК [10]. В первом случае показатель отражает общую синтетическую активность клетки, которая лежит в основе физиологической регенерации внутриклеточных структур и ферментных систем клетки, во втором случае – скорость биосинтеза ДНК, что позволяет оценить пролиферативную активность клеток, так как тимидин включается в ДНК в S-фазе клеточного цикла.

На рис. 2 представлена динамика изменения скорости биосинтеза ДНК и белка при культивировании в бессывороточной среде. Как видно, в этих условиях максимальные значения скорости включения [³H]-тимидина в ДНК и [¹⁴C]-лейцина в белок наблюдались в первые часы культивирования клеток. Скорость биосинтеза ДНК через 8 ч снижалась в 2,3 раза, через 24 ч – в 6,6 раза и через 48 ч – в 14 раз (рис. 2, а). Подобное, хотя и менее выраженное уменьшение наблюдалось при анализе скорости биосинтеза белка в клетках (рис. 2, б). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном снижении

функциональной активности клеток костного мозга в процессе их культивирования в бессывороточной среде RPMI-1640.

Для изучения влияния разных типов сывороток крови на функциональную активность клеток костного мозга использовали условия, описанные выше, но питательная среда RPMI-1640 содержала разное количество сыворотки. Результаты, представленные на рис. 3, демонстрируют эффект инактивированной при 56 °C сыворотки крови половозрелых крыс и инактивированной при таких же условиях ЭТС. Видно, что через 24 ч в присутствии 1 % сыворотки крови крыс скорость биосинтеза ДНК в клетках была в 4,7 раза больше, чем в контрольной группе. Однако с увеличением содержания в среде сыворотки до 2 % и 5 % наблюдалось ингибирование данного показателя в 2,3 и 2,9 раза соответственно (см. рис. 3). Подобный характер изменений обнаружен в присутствии нативной (не инактивированной) сыворотки крови человека (рис. 4, а). Эти изменения, вероятно, связаны с цитотоксичностью, которая начинает проявляться при превышении определенной концентрации сыворотки в среде. При внесении в питательную среду ЭТС, напротив, наблюдался дозозависимый стимулирующий эффект. По сравнению с контролем, скорость синтеза ДНК в присутствии 1, 2 и 5 % ЭТС возрастала в 3,0, 7,6 и 14,0 раза соответственно. Подобные, но менее выраженные изменения данного показателя наблюдались в присутствии инактивированной сыворотки человека (рис. 4, б). Таким

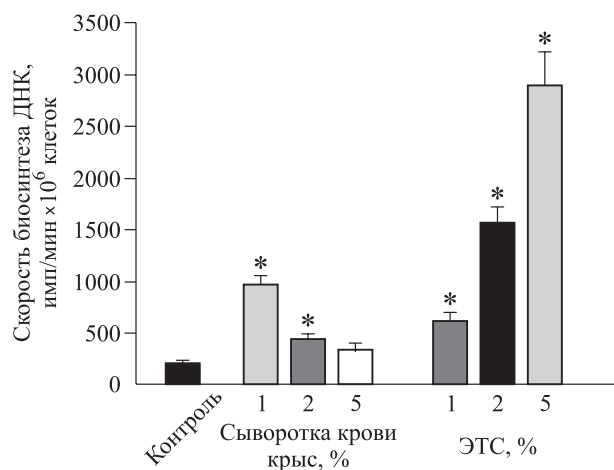


Рис. 3. Дозозависимые эффекты сыворотки крови половозрелых крыс и ЭТС на биосинтез ДНК в клетках костного мозга, культивируемых 24 ч в питательной среде RPMI-1640. Звездочкой (*) отмечены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от контроля

Fig. 3. Dose-dependent effects of blood serum of adult rats and fetal calf serum on DNA synthesis in bone marrow cells cultured 24 hours in RPMI-1640 nutrient medium. An asterisk (*) indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from the control

образом, представленные результаты подтверждает известный факт, что наиболее выраженное стимулирующее действие на жизнеспособность и функциональную активность культивируемых клеток оказывает эмбриональная сыворотка животного происхождения. Этот эффект связан с

тем, что эмбриональные сыворотки содержат наиболее оптимальное соотношение факторов роста, гормонов и энергетических субстратов, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток в условиях *in vitro*.

Поскольку ранее нами обнаружено, что культивирование изолированных клеток печени в присутствии апо А-I сопровождается повышением скорости биосинтеза общего белка в гепатоцитах и резидентных макрофагах [4], в настоящем исследовании мы изучили влияние апо А-I, конъюгированного с коллоидным золотом, на функциональную активность клеток костного мозга в процессе их культивирования. Клетки инкубировали в бессывороточной питательной среде RPMI-1640 при 37 °C в CO₂-инкубаторе в присутствии 30 мкг/мл конъюгата коллоидного золота с апо А-I. Через 60 мин клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 400 g) и 2 раза отмывали от свободного (не связавшегося) конъюгата, используя охлажденный физиологический раствор (0,9 % NaCl) на фосфатном буфере. Как видно из рис. 5, инкубирование клеток в бессывороточной среде в присутствии апо А-I, меченного частицами золота, сопровождается их проникновением внутрь клеток.

Для оценки способности выделенного белка поддерживать жизнеспособность клеток в процессе их культивирования использовали бессывороточную среду RPMI-1640. Об изменении функциональной активности клеток судили по скорости биосинтеза белка и ДНК. Как отмечено выше, биосинтетическая активность клеток костного мозга значительно ингибируется при

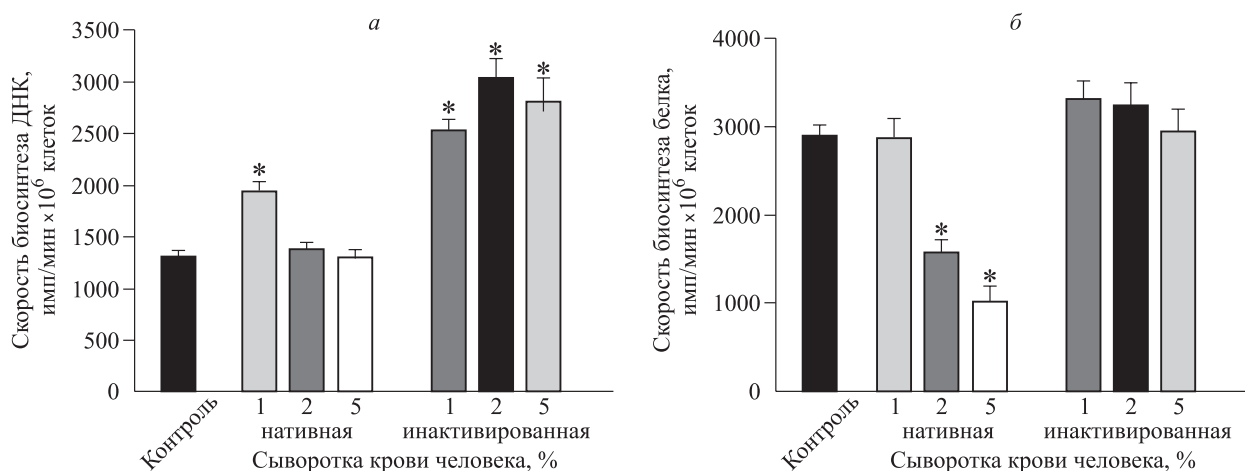


Рис. 4. Влияние нативной и инактивированной сыворотки крови человека на биосинтез белка (а) и ДНК (б) в клетках костного мозга, культивируемых 24 ч в питательной среде RPMI-1640. Звездочкой (*) отмечены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от контроля

Fig. 4. The effect of native and inactivated human blood serum on the protein synthesis (A) and DNA synthesis (B) in bone marrow cells cultured 24 hours in RPMI-1640 nutrient medium. An asterisk (*) indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from the control

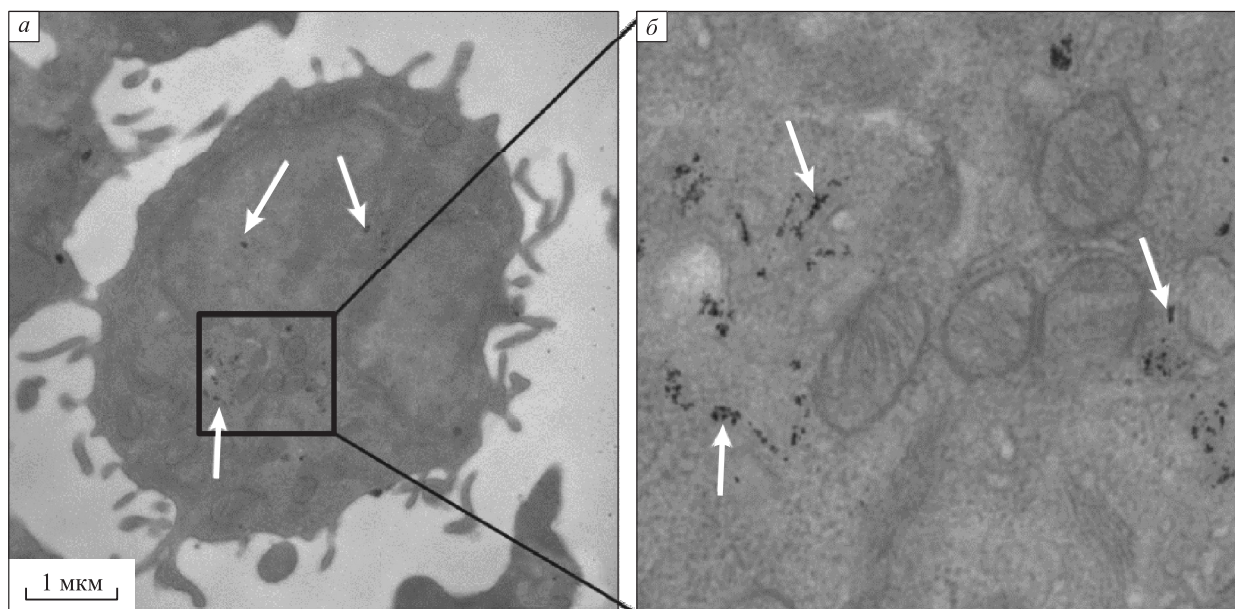


Рис. 5. Электронная микрофотография клеток костного мозга, инкубированных в течение 60 мин при 37 °С в бессывороточной питательной среде RPMI-1640, содержащей меченный коллоидным золотом белок апо А-I: а – клетка целиком, б – увеличенный фрагмент центральной части клетки. Стрелками показаны локализованные в цитоплазме частицы коллоидного золота

Fig. 5. Electron micrograph of bone marrow cells incubated for 60 min at 37 °C in serum-free nutrient medium RPMI-1640 containing apoA-I protein labeled with colloidal gold: а – the whole cell, б – an enlarged fragment of the cell central part. Arrows indicate colloidal gold particles localized in the cytoplasm

культивировании в бессывороточной среде. Добавление в питательную среду ЭТС стимулирует биосинтез белка и ДНК, предотвращая снижение функциональной активности клеток. Подобный стимулирующий эффект обнаружен при добавлении в питательную среду 15 мкг/мл апо А-I. Как видно из рис. 6, по сравнению с контрольной группой (без апо А-I) скорость биосинтеза ДНК в присутствии апо А-I была выше на 55 % через 8 ч, на 523 % через 24 ч и на 219 % через 48 ч. В этих условиях также возрастала скорость биосинтеза белка. Так, через 24 ч скорость включения [¹⁴С-лейцина] в общий белок в присутствии апо А-I была на 79 % выше, чем в контрольной группе (без апо А-I). Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление апо А-I в культуральную питательную среду позволяет сохранить функциональную активность культивируемых клеток. Можно допустить, что известный стимулирующий эффект эмбриональной сыворотки на жизнеспособность культивируемых клеток связан с присутствием в ней в том числе ЛПВП и апо А-I [11]. Из представленных результатов видно, что апо А-I по сравнению с контролем наиболее выражено сохраняет активность клеток костного мозга в первые сутки культивирования. Для получения продолжительного эффекта, вероятно, необходимо включение в состав

питательной среды гормонов, ростовых и колониестимулирующих факторов.

В качестве замены ЭТС предлагается использовать лизат тромбоцитов человека [12], в котором содержится значительно больше, чем в сыворотке, эстрадиола, тестостерона, инсулина,

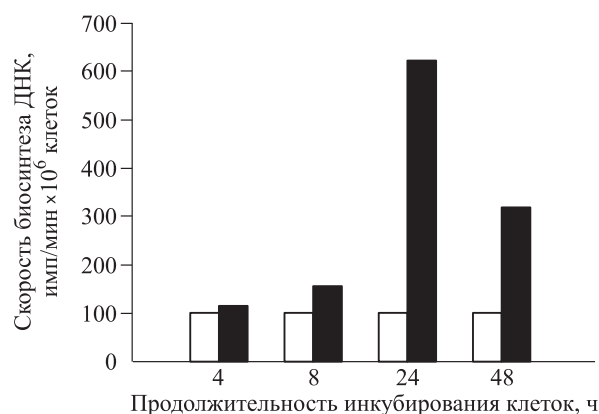


Рис. 6. Влияние апо А-I (темные столбики) на скорость биосинтеза ДНК в клетках костного мозга, культивируемых в бессывороточной среде RPMI-1640 в течение 48 ч; контроль принят за 100 % (светлые столбики)

Fig. 6. The effect of apo A-I (grey bars) on the rate of DNA synthesis in bone marrow cells cultured in serum-free RPMI-1640 medium for 48 hours, control (open bars) accepted for 100 %

тромбоцитарного фактора роста, трансформирующего фактора роста- β 1 и сосудистого эндотелиального фактора роста. Следует отметить, что после термической инактивации при 56 °C способность стимулировать пролиферацию исчезает у лизата тромбоцитов и сохраняется у сыворотки [13].

Известна бессывороточная питательная среда для культивирования клеток костного мозга, содержащая глутамин, человеческий сывороточный альбумин, трансферрин, инсулин, фактор стволовых клеток, интерлейкин-1, интерлейкин-3, интерлейкин-6, ГМ-КСФ, Г-КСФ, макрофагостимулирующий фактор и эритропоэтин [14], а также среда, основанная на использовании смеси, содержащей инсулин, трансферрин, фактор роста стволовых клеток, лиганд тирозинкиназы-3 из фетальной печени, тромбопоэтин и иономицин [15]. Недостатками перечисленных составов сред является многокомпонентность, необходимость использования дорогостоящих ростовых факторов, а также включение в состав белков ксеногенного происхождения.

Как известно, в качестве компонентов питательной среды могут быть использованы рекомбинантные белки. Однако их получение и очистка от высокотоксичных липополисахаридов клеточных стенок прокариот являются трудоемким и дорогостоящим процессом. Кроме того, в отличие от нативного белка, его рекомбинантные аналоги часто имеют низкую растворимость и стимулирующую активность, что является следствием незавершенного рефолдинга белка в процессе его очистки и пересадки [16].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие апо А-I в бессывороточной питательной среде сохраняет функциональную активность культивируемых клеток костного мозга. Учитывая, что регуляторный эффект апо А-I достигается при небольшой концентрации белка, использование апо А-I, выделенного из сыворотки крови пациента, позволит получить практически безопасную питательную среду для культивирования аутологичных клеток костного мозга с целью их использования для персонализированной клеточной терапии и тканевой инженерии.

Список литературы / References

1. Нечаева Е.А., Радаева И.Ф., Думченко Н.Б., Сумкина Т.П., Богрянцева М.П., Сенькина Т.Ю. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток и вирусов. *Вестн. ПНИПУ. Хим. технол. и биотехнол.* 2018; (4): 85–97. doi: 10.15593/2224-9400/2018.4.07

Nechaeva E.A., Radaeva I.F., Dumchenko N.B., Sumkina T.P., Bogryantseva M.P., Senkina T.Yu. Serum free medium for cultivation of cells and viruses. *Vestnik Permskogo natsional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya = Bulletin of Perm National Research Polytechnic University. Chemical technology and biotechnology.* 2018; (4): 85–97. [In Russian]. doi: 10.15593/2224-9400/2018.4.07

2. Ткачук В.А., Акопян Ж.А., Калинина Н.И., Кочегура Т.Н., Тарасова Е.В., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., Сысоева В.Ю., Чапленко А.А., Сагарадзе Г.Д. Способ получения средства для стимуляции регенерации на основе продуктов секреции мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Пат. РФ 2620167; Опубл. 23.05.2017.

Tkachuk V.A., Akopyan Zh.A., Kalinina N.I., Kochegura T.N., Tarasova E.V., Efimenko A.Yu., Grigoryeva O.A., Sysoeva V.Yu., Chaplenko A.A., Sagaradze G.D. A method of obtaining a means for stimulating regeneration based on the secretion products of multipotent mesenchymal stromal cells of a person. Patent RF 2620167; Published 23.05.2017. [In Russian].

3. Трухан И.С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих. *Международ. журн. прикл. и фундам. исследований.* 2018; 12 (1): 165–172. doi: 10.17513/mjpf.12541

Trukhan I.S. Culture medium as a key factor in the cultivation of mammalian cells. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research.* 2018; 12 (1): 165–172. [In Russian]. doi: 10.17513/mjpf.12541

4. Усынин И.Ф., Панин Л.Е. Механизмы формирования фенотипической гетерогенности гепатоцитов. *Биохимия.* 2008; 73 (4): 453–468.

Usynin I.F., Panin L.E. Mechanisms determining phenotypic heterogeneity of hepatocytes. *Biokhimiya = Biochemistry (Mosc.).* 2008; 73 (4): 367–380. doi: 10.1134/s0006297908040019

5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск, 1992. 264 с.

Goldberg E.D., Dygay A.M., Shakhov V.P. Methods of tissue culture in hematology. Tomsk, 1992. 264 p. [In Russian].

6. Mills G.L., Lane P.A., Weech P.K. A guidebook to lipoprotein technique. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 14. Eds. R.H. Burdon, R.H. Knippenberg P.H. Amsterdam: Elsevier, 1984. 18–116.

7. Cham B.E., Knowlee B.R. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res.* 1976; (17): 176–181.

8. Jiang L., Hea L., Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample prepara-

- tion prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1023 (2): 317–320. doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.029
9. Slot J.W., Geuze H.J. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* 1985; 38 (1): 87–93.
10. Dawson C.W., Young L.S. *In vitro* assays to study epithelial cell growth. *Methods Mol. Biol.* 2001; 174: 165–172. doi: 10.1385/1-59259-227-9:165
11. Forte T.M., Bell-Quint J.J., Cheng F. Lipoproteins of fetal and newborn calves and adult steer: a study of developmental changes. *Lipids*. 1981; 16 (4): 240–245. doi: 10.1007/BF02535023
12. Astori G., Amati E., Bambi F., Bernardi M., Chierigato K., Schäfer K., Sella S., Rodeghiero F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the *ex-vivo* expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res. Ther.* 2016; 7 (1): 93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x.2
13. Сергеева Н.С., Шанский Я.Д., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Кувшинова Е.А., Мейснер И.С. Биологические эффекты тромбоцитарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека. *Гены и клетки*. 2014; (1): 77–85.
- Sergeeva N.S., Shansky Ya.D., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Akhmedova S.A., Kuvshinova E.A., Meisner I.S. Biological effects of platelet lysate when added to human cell culture medium. *Geny i kletki = Genes and Cells*. 2014; (1): 77–85. [In Russian].
14. Brown R.L. Serum-free medium supporting growth and proliferation of normal bone marrow cells. US Patent № 5766951; Published 16.06.1998.
15. Быковская С.Н., Лысюк Е.Ю. Способ увеличения количества гемопоэтических недифференцированных стволовых клеток пациента *ex vivo*. Пат. РФ 2360965; Опубли. 10.07.2009.
- Bykovskaya S.N., Lysyuk E.Yu. The method of increasing the number of hematopoietic undifferentiated stem cells of a patient *ex vivo*. Patent RF 2360965; Published 10.07.2009. [In Russian].
16. Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998; 9 (2): 157–163. doi: 10.1016/S0958-1669(98)80109-

Сведения об авторах:

Анна Юрьевна Городецкая, ORCID: 0000-0002-5339-3851, e-mail: a.pe4enkina@yandex.ru
Татьяна Александровна Ткаченко, ORCID: 0000-0002-3783-4418, e-mail: vadanyata@mail.ru
Алексей Николаевич Дударев, ORCID: 0000-0003-1639-6196, e-mail: alexdud@ngs.ru
Игорь Олегович Чешенко, ORCID: 0000-0002-7384-9115, e-mail: cheshenko@mail.ru
Иван Федорович Усынин, д.б.н., ORCID: 0000-0003-1752-9034, e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

Information about the authors:

Anna Yu. Gorodetskaya, ORCID: 0000-0002-5339-3851, e-mail: a.pe4enkina@yandex.ru
Tatyana A. Tkachenko, ORCID: 0000-0002-3783-4418, e-mail: vadanyata@mail.ru
Alexey N. Dudarev, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-1639-6196, e-mail: alexdud@ngs.ru
Igor O. Cheshenko, ORCID: 0000-0002-7384-9115, e-mail: cheshenko@mail.ru
Ivan F. Usynin, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0003-1752-9034, e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

Поступила в редакцию 13.04.2020
После доработки 19.06.2020
Принята к публикации 08.07.2020

Received 13.04.2020
Revision received 19.06.2020
Accepted 08.07.2020