

ЕФЕКТИВНІСТЬ КЛОНУВАННЯ ПЕРВИННИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛІВ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ

М.О. Малюк, кандидат ветеринарних наук, доцент

Проведені експериментальні дослідження свідчать, що у кістковому мозку кролів містяться різні фракції клітин, які здатні до проліферації. За відповідних умов зберігання частина стовбурових клітин із високим потенціалом до цитодиференціювання гине, як більш диференційована фракція, а менш диференційовані фракції клітин кісткового мозку зберігають здатність до клонування. При цьому не виключена часткова втрата ними проліферативного потенціалу.

Мультипотентні стовбурові клітини, кістковий мозок, прогеніторні клітини, клонування.

Відомо, що під час заморожування кісткового мозку людей та подальшого розморожування, клітини, які він містить та які здатні утворювати колонії у культурі, залишаються життєздатними протягом декількох років. Відомо, що клітини, які зберігалися до 16 років за низьких температур, після розморожування та культивуванні в агарі, здатні до активної проліферації, утворюючи при цьому кластери і колонії. Висока стійкість кровотворних клітин-попередниць, ймовірно, пов'язана із тим, що у природних умовах ці клітин перебувають поза проліферативним пулом, тобто у дормантному стані [5]. Окрім кровотворних стовбурових клітин, у кістковому мозку існують і мультипотентні стовбурові клітини, які мають вирішальне значення у процесах кровотворення, створюючи кровотворне мікрооточення, а також мають властивість диференціюватися у різні типи клітин тваринного організму [4].

На сьогодні відсутні дані щодо здатності мультипотентних стовбурових клітин тварин підтримувати свою життєздатність за тривалого зберігання аспірату кісткового мозку (КМ) в умовах низької температури. Оскільки кількість лабораторій для культивування клітинного матеріалу і висококваліфікованих фахівців в Україні обмежена, а виділення кісткового мозку тварин (спортивних коней, цінних порід собак, циркових тварин), досить часто відбувається на далекій відстані від лабораторій, тому встановлення оптимальних умов зберігання і транспортування аспірату КМ тварин для виділення і клонування соматичних стовбурових клітин тваринного організму має як теоретичне, так і практичне значення.

Мета дослідження – вивчити здатність первинних мультипотентних стовбурових клітин тварин підтримувати свою життєздатність за різних умов зберігання аспірату КМ.

Матеріали і методи дослідження. Проведено три серії досліджень. У першій серії досліджень (*клітини контрольної групи*) кістковий мозок кролів протягом 60 хв висівали у чашки Петрі ($S = 9,6 \text{ см}^2$). При цьому, під час висівання суспензії клітин, кістковий мозок розділяли на дві рівномірні частини: із першої частини аспірату центрифугуванням його у градієнті щільності ($\rho = 1,077$) протягом 20 хв при відцентровій силі 300 g виділяли моноклеарні клітини, які висівали у чашки Петрі і ставили на культивування. Другу частину аспірату кісткового мозку також центрифугували, але без використання градієнта щільності. Отриманий під час центрифугування нерозділений на фракції осад клітин (моноклеари, лімфоцити, моноцити, еритроцити та ін.) висівали у чашки Петрі і ставили на культивування.

У другій серії досліджень (*клітини першої дослідної групи*) після відбору кістковий мозок розбавляли середовищем 199 у співвідношенні 1:2 та зберігали протягом 48 год за $t + 4^\circ\text{C}$ у холодильнику. Через 48 год кістковий мозок розділяли на дві рівномірні частини і проводили маніпуляції у такій же послідовності, як і у першій серії досліджень.

У третій серії досліджень (*клітини другої дослідної групи*) після відбору кістковий мозок відразу поміщали у холодильник та зберігали протягом 48 год за $t + 4^\circ\text{C}$. Через 48 год кістковий мозок розділяли на дві рівномірні частини і проводили маніпуляції у такій же послідовності, як і у попередніх двох серіях досліджень.

Клітини кісткового мозку контрольної, першої та другої дослідних груп культивували у чашках Петрі ($S = 9,6 \text{ см}^2$), використовуючи стандартне середовище: DMEM – 80 %, ембріональна сироватка телят – 20 % (“Sigma”, США) з додаванням 10 мкл/см^3 середовища антибіотика-антимікотика. Культивування проводили у CO_2 -інкубаторі за $t 37^\circ\text{C}$ та 5 % концентрації CO_2 . При цьому МСК осідали, прикріплюючись до поверхні культуральних чашок Петрі і розпластувалися. Суспензовану культуру гемопоетичних клітин згодом видаляли, після чого продовжували культивувати лише ті клітини, які мають адгезивні властивості. Суспензію клітин отримували, використовуючи 0,5/0,2 % - й розчин трипсину/ЕДТА [2]. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Підрахунок кількості клітин проводили у камері Горяєва. Загальну концентрацію клітин обчислювали за такою формулою:

$$X = \frac{A \times 1000}{0,9}$$

де X – кількість клітин у 1 см^3 досліджуваної суспензії;

A – кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва;

1000 – кількість кубічних міліметрів у 1 см^3 ;

0,9 – об’єм рахункової камери Горяєва, мм^3 .

Загальну кількість клітин вираховували множенням отриманого числа « X » на об’єм досліджуваної клітинної суспензії.

Результати дослідження. Як свідчать результати досліджень, апробовані нами умови зберігання аспірату КМ фактично не впливають на життєздатність мультипотентних стовбурових клітин, проте мають суттєвий вплив на їх проліферативну активність.

У першій серії досліджень встановлено, що під час культивування моноклеарні клітини, які були отримані методом градієнтного центрифугування аспірату КМ, на 11-й день утворювали 90 – 95 % моношару. Кількість клітин на 1 см² становила – 78,31 тис (табл.1, рис. 1-а). У той же час за культивування суміші нефракціонованих клітин кісткового мозку ми спостерігали, що клітини ростуть колоніями різної форми та розміру, незалежно одна від одної, між собою не з'єднуються. Кількість отриманих клітин на 1 см² становила 33,08 тис (табл. 1, рис. 1-б).

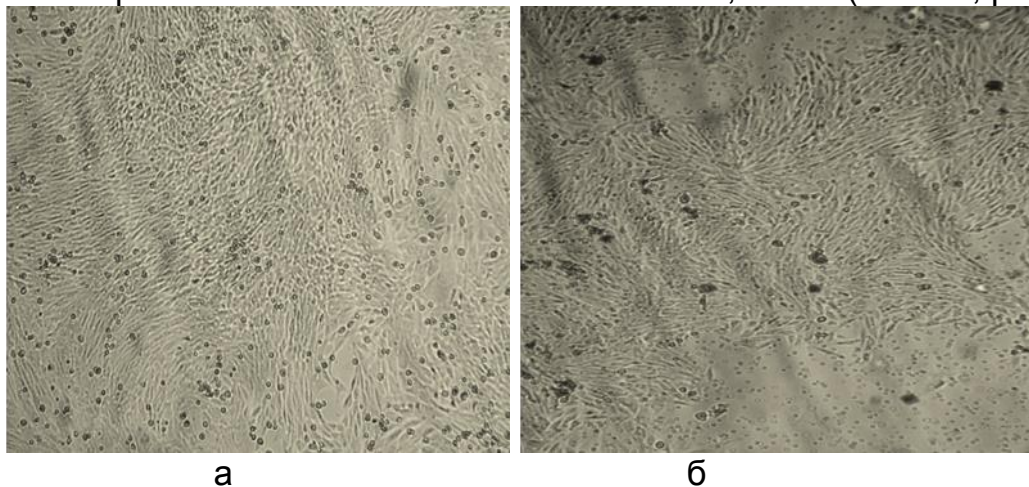


Рис.1. Мультипотентні стовбурові клітини контрольної групи
(а – після висівання моноклеарів кісткового мозку; б – після висівання суміші клітин кісткового мозку) x100

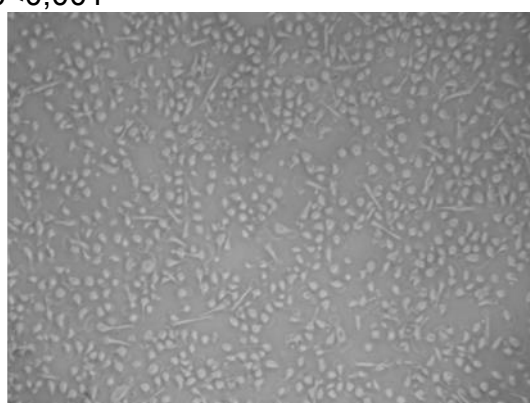
У другій серії досліджень під час культивування моноклеарів, які були отримані методом градієнтного центрифугування суспензії клітин кісткового мозку на 11-й день культивування встановили, що кількість культивуючих клітин на 1 см² становить 14,30 тис (табл. 1). Під час мікроскопічного дослідження цих клітин траплялись поодинокі колонії (14 шт) та чисельні скупчення клітин округлої форми, які не розпластувались по дну чашки Петрі, займаючи близько 10 % її площі (рис. 2-а). У той же час, ефективність клонування стовбурових клітин кісткового мозку, які зберігалися та висівались у поживне середовище разом із іншими клітинами кісткового мозку значно вища і становила 27,80 тис клітин/см², що на 94 % більше порівняно із клітинами, які були виділені у градієнті щільності філол-верографінового розчину (табл. 1). При мікроскопічному дослідженні виявлено 25 колоній великого розміру, які зливались у суцільний моношар. При цьому траплялися велика кількість клітин овальної форми (30 % моношару). Очевидно, середовище 199, у якому зберігалися клітини протягом 48 год, спонукає до активної трансформації стовбурових клітин кісткового мозку у транзиторні клітини. Особливо це

стосується клітин, які були отримані методом градієнтного центрифугування (рис. 2-б).

1. Проліферативна активність стовбурових клітин кісткового мозку кроля за різних умов зберігання та культивування ($M \pm m$, $n = 3$)

Групи клітин	Посадкова кількість клітин на 1 см^2	Кількість клітин, отриманих на 1 см^2 , тис	
		культивування мононуклеарів кісткового мозку	культивування суміші клітин кісткового мозку
Контрольна	65×10^4	$78,31 \pm 3,74$	$33,08 \pm 2,90$
Перша дослідна	65×10^4	$14,30 \pm 0,84^{***}$	$27,80 \pm 1,46$
Друга дослідна	65×10^4	$25,83 \pm 1,06^{***}$	$39,01 \pm 1,20$

***- $p < 0,001$



а



б

Рис. 2. Мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку кроля, який зберігався у середовищі 199 протягом 48 год за $t+4^\circ\text{C}$:

а – після висівання мононуклеарних клітин кісткового мозку;

б – після висівання суміші клітин кісткового мозку) $\times 100$

У третій серії досліду під час культивування мононуклеарів, які були отримані методом градієнтного центрифугування суспензії клітин кісткового мозку на 11-й день культивування встановлено, що кількість клітин, отриманих на 1 см^2 , становила 25,83 тис (табл. 1). При мікроскопічному дослідженні цих клітин виявлена велика кількість колоній (34 шт), які зливалися між собою та утворювали моношар, який охоплював близько 15 % площі дна чашки Петрі. При цьому клітини округлої форми майже не спостерігали (рис. 3-а). Ефективність клонування стовбурових клітин кісткового мозку, які зберігались і висівались у поживне середовище разом з іншими клітинами кісткового мозку становила 39,01 тис клітин / 1 см^2 площі, що на 34 % більше порівняно із клітинами цієї серії досліду, які попередньо були пропущені через градієнт щільності (табл. 1). При мікроскопічному дослідженні культивуючих клітин виявлено 50 колоній великого розміру, які становили близько 50 % моношару (рис 3-б).

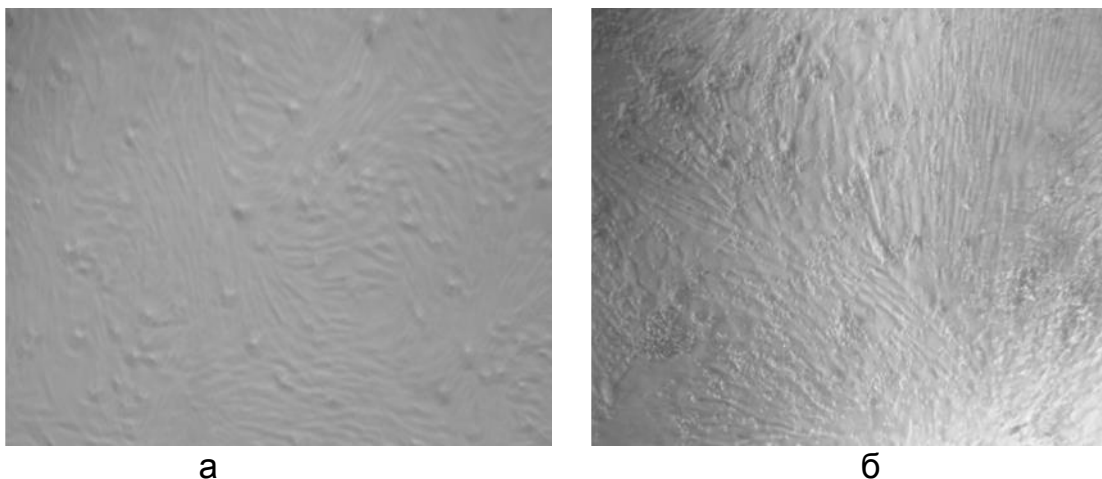


Рис. 3. Мультипотентні стовбурові клітини кісткового мозку кроля, який зберігався без середовища 199 протягом 48 год при $t+4^{\circ}\text{C}$
 (а – після висівання моноклеарних клітин кісткового мозку;
 б – після висівання суміші клітин кісткового мозку) $\times 100$

Отже, порівняльний аналіз свідчить, що умови зберігання кісткового мозку кролів суттєво впливають на проліферативну активність мультипотентних стовбурових клітин. Клітини кісткового мозку, який зберігався у середовищі 199 протягом 48 год за $t +4^{\circ}\text{C}$ знижують свій проліферативний потенціал порівняно з клітинами КМ, який зберігався протягом 48 год за $t +4^{\circ}\text{C}$ без середовища 199. Наші дослідження не узгоджуються із дослідженнями В.С. Астахової [1]. Можливо такі розбіжності виникають тому, що автори застосовували інші методичні підходи під час культивування клітин кісткового мозку людей.

Очевидно, що у кістковому мозку тварин існують різні фракції клітин, які здатні до проліферації. При відповідних умовах зберігання частина стовбурових клітин із високим потенціалом до цитодиференціювання гине, як більш диференційована фракція. У менш диференційованій фракції стовбурових клітин зберігається проліферативна активність. При цьому не виключена часткова втрата ними проліферативного потенціалу.

Висновки

1. Умови зберігання кісткового мозку кролів суттєво впливають на проліферативну активність мультипотентних стовбурових клітин.
2. Встановлено, що у кістковому мозку кролів існує резистентна фракція стовбурових клітин, яка здатна до активного клонування після 48 годин зберігання за $t +4^{\circ}\text{C}$.

Список літератури

1. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека / Астахова В.С. // К.: Феникс, 2000. – 176 с.
2. Методичні рекомендації “Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів” / [Мазуркевич А.Й., Данілов В.Б., Малюк М.О. та ін.]. – К., 2012. – С. 42.

3. Патент України на корисну модель № 40805, МПК (2009) A61K 35/28. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин / Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ткаченко С.М., Ковпак В.В.; – № u 2008 13659. заявл. 26.11.2008; Опубл. 27.04.2009. Бюл. № 8.

4. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э. Н. Иванов – Луганск: Прес-експресс, 20011. – 367с.

5. Тимакова Л.А. // Проблемы гематологии. – 1982. – № 4 – С. 17–19.

6. Takahashi M., Singer J.W. Effects of marrow storage at 40 C subsequent generation of long – term marrow cultures / M. Takahashi, J.W. Singer // Exp. Hematol. – 1985. – Vol. 13, № 7. – P. 691 – 695.

Проведенные экспериментальные исследования подтверждают, что в костном мозге кролей находятся разные фракции клеток, способные к пролиферативной активности. При соответствующих условиях хранения часть стволовых клеток с высоким потенциалом к цитодифференцировке гибнет, а менее дифференцированные фракции клеток костного мозга сохраняют свойства клонирования. При этом не исключена частичная потеря ими пролиферативного потенциала.

Мультипотентные стволовые клетки, костный мозг, прогениторные клетки, клонирование.

Summary. Experimental studies show that bone marrow of rabbits contains different fractions of cells that are capable to proliferation. Under appropriate conditions of storage a part of stem cells with a high potential to differentiation dies and less differentiated fraction of bone marrow cells retain the ability to cloning. During cloning does not exclude a partial loss of their proliferative potential.

Multipotent stem cells, bone marrow, progenitor cells, cloning.