

**ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ СИРОВАТОК РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН НА
ЕФЕКТИВНІСТЬ КЛОНУВАННЯ ПЕРВИННИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛІВ**

К. О. МОСКАЛЬОВА, магістр;

М. О. МАЛЮК, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: moskalova93@mail.ru

Анотація. *Встановлено, що культивування стовбурових клітин кісткового мозку кроля в присутності сироватки крові коня призводить до активної адгезії та проліферації цих клітин. Підвищення клоногенної і проліферативної активності недиференційованих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля, очевидно, відбувається за рахунок наявності в сироватці крові коня цитокінів, які виводять із дормантного стану культивуючи клітини на нульовому пасажі, а також активують маркери проліферації цих клітин, що, в свою чергу, доводить можливість часткової заміни ембріональної телячої сироватки на сироватку крові коня.*

Ключові слова: *мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, проліферація, ембріональна сироватка телят, сироватка крові коня*

Майбутнє гуманної та ветеринарної медицини на сьогодні безпосередньо пов'язують із розвитком клітинних технологій. Завдяки цим технологіям вдається поновлювати клітинний склад ушкоджених органів і тканин. Таке відновлення структурно-функціональних елементів органу, може вирішувати такі ж завдання, як і трансплантація органів. Отже, клітинні технології розширюють можливості клітинно-регенеративної терапії, роблячи її доступною для різних видів тварин (собаки, коти, коні). Основою для розвитку клітинних технологій являються стовбурові клітини, які здатні залежно від мікрооточення диференціюватися в клітини різних видів тканин. Також клітини із високими проліферативними властивостями (стовбурові клітини) можуть давати багато функціонально активних нащадків. У зв'язку з цим, в світі активно розробляються підходи до ефективного нарощування стовбурових

клітин з метою подальшого використання для клітинно-регенеративної терапії [1].

Окрім цього, науковцями встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) здатні пригнічувати проліферацію Т-лімфоцитів *in vitro*, пригнічувати диференціювання дендритних клітин і, таким чином, проявляти імуносупресивну дію [Error! Reference source not found.]. Ця властивість МСК використовується в трансплантології для пригнічення реакції «трансплантат проти господаря» (РТПГ). Також встановлено, що МСК впливають на приживлення гемопоетичних стовбурових клітин під час їх трансплантації *in vivo* [Error! Reference source not found.]. В даний час культивовані МСК намагаються використовувати в ортопедії, хірургії, кардіології і неврології в гуманній і ветеринарній медицині [2].

Отже, у вирішенні сучасних теоретичних і практичних проблем ветеринарної біотехнології суттєве місце займає культивування клітин тваринного організму *in vitro*.

У зв'язку з цим проблема розробки умов найбільш ефективного клонування МСК є надзвичайно актуальною. Необхідно подальше вдосконалення методів культивування, що дозволяє отримати нові культури клітин. Важливим компонентом поживних середовищ, що містить фактори росту недиференційованих стовбурових клітин, є сироватка крові тварин. Вона залишається незамінним компонентом ростового середовища для більшості клітинних культур [1]. Значення сироватки крові для росту клітин, виявлення її компонентів, які стимулюють проліферацію, є предметом інтересу багатьох дослідників. Найбільш часто для цієї цілі використовують сироватку крові плодів великої рогатої худоби, але її широке використання обмежується, перш за все, дефіцитом і високою вартістю [Error! Reference source not found.]. Для зменшення витрат цього компонента середовища вдаються до заміни її сироваткою від інших тварин, додавання в поживні середовища очищених факторів росту, гормонів і білків, багато з яких є не менш економічно затратними. Разом з тим сироватка крові плодів корів являється одним із

головних лімітуючих факторів за великомасштабного культивування стовбурових клітин і тому пошук заміни її більш дешевими сироватками є перспективним [Error! Reference source not found.].

Отже, вивчення проліферативної активності мультипотентних стовбурових клітин за умов часткової заміни ембріональної телячої сироватки на сироваткою коня є актуальним завданням.

Мета дослідження – вивчити вплив комбінації ембріональної телячої сироватки і сироватки крові коня на ефективність клонування первинних мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кроля.

Матеріали і методи дослідження. Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку стегнової кістки кроля. Перед початком виконання оперативного втручання проводили садацію тварини за допомогою внутрішньо-м'язового введення ксилазин-ацепромазинової суміші з розрахунку 3 мг ксилазину та 1 мг ацепромазину на 1 кг маси тіла тварини. В місці оперативного доступу виконували інфільтраційну анестезію шкіри і підшкірної клітковини 0,5 %-им розчином новокаїну. Оперативне поле, розміром 1,5×1,5 см вибривали і дворазово обробляли 5 %-им спиртовим розчином йоду, після чого шкіру на 0,5 см зміщали і проколювали за допомогою скальпеля. В отриманий отвір вводили голку для кістково-мозкової пункції з мандреном і проколювали м'які тканини, доходячи до окістя кістки. Помірним натисканням на голку з одночасними ротаційними рухами, просували голку в товщу губчастої кісткової тканини на 0,5-1 см. Виймали мандрен і до канюлі голки приєднували шприц об'ємом 10 см³ із гепарином, з розрахунку 2-3 ОД на 1 см³ очікуваного об'єму аспірату кісткового мозку. Поволі аспірували кістковий мозок. Після отримання кісткового мозку, голку не від'єднуючи від шприца, виймали, а до проколу шкіри на 1-2 хв прикладали стерильний ватно-марлевий тампон. Після зупинки кровотечі, шкіру в ділянці проколу обробляли 5 %-им спиртовим розчином йоду [3].

З метою отримання фракції мононуклеарних клітин аспірат кісткового мозку у 2 рази розводили фосфатно-буферним розчином, після чого

центрифугували протягом 25 хв у градієнті щільності фікол-тріомбразу ($\rho = 1,072$) за відцентрової сили 300 g. Отримані таким чином моонуклеарні клітини у кількості $63 \times 10^4 / \text{см}^2$ вносили у чашки Петрі ($d = 35$ мм).

З метою дослідження можливості часткової заміни ембріональної сироватки теляти на сироватку від дорослих тварин, а також впливу цієї сироватки на колонієформуючу здатність та проліферативний потенціал стовбурових клітин на 0 пасажі, до складу культурального середовища в дослідних чашках Петрі вводили 5 % (від загального об'єму середовища) сироватки крові коня, залишивши незмінним вміст DMEM та зменшивши вміст ембріональної сироватки теляти до 15 %. Отже, нами було сформовано дві групи культивуємих клітин: контрольну (80 % – DMEM, 20 % – ембріональна сироватка теляти) та дослідну (80 % – DMEM, 15% – ембріональна сироватка теляти, 5 % – сироватка крові коня). Клітини пересаджували у співвідношенні 1:2. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

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

$$X = \frac{A \times 1\,000}{0,9}$$

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

A – кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва;

1000 – кількість мм^3 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 досліджень та їх обговорення. В таблиці 1 наведено дані щодо впливу комбінації сироваток різних видів тварин на проліферативну активність некомітованих стовбурових клітин кісткового мозку кроля на

нульовому і першому пасажах. Результати експериментальних досліджень підтверджуються фотографічно (рис. 1, 2).

Аналіз результатів колонієформуючої здатності і проліферативного потенціалу стовбурових клітин кісткового мозку кроля на 0 та 1 пасажах показав, що склад культурального середовища має суттєвий вплив на швидкість прояву колонієформуючої здатності клітин та їх проліферативну активність.

Так, у досліді з частковою заміною ембріональної сироватки теляти на сироватку крові коня (дослідна група клітин) перші колонії клітин починали з'являтися/формуватися вже на 5-6 добу культивування, тоді як у контрольних чашках Петрі – лише на 6-7 добу (табл. 1). Слід відмітити, що колонії в культуральних чашках клітин дослідної групи були набагато чисельнішими та рівномірно розміщувалися всією площею дна чашок, порівняно з культуральними чашками контрольної групи.

Таблиця 1. Вплив різного складу культурального середовища на проліферативну активність первинних мультипотентних стовбурових клітин кісткового мозку кроля ($M \pm m, n = 3$)

Групи клітин	Посад-кова кількість клітин на 1 см ²	Кількість колоній, шт	Кількість клітин, отриманих на 1 см ² , тис	
			нульовий пасаж	перший пасаж
Контрольна	63×10^4	9-13	$53,9 \pm 5,1$	$55,5 \pm 5,3$
Дослідна	63×10^4	15-18	$71,2 \pm 3,1^*$	$90,6 \pm 8,2$

Примітка. * $p < 0,05$ порівняно із клітинами контрольної групи

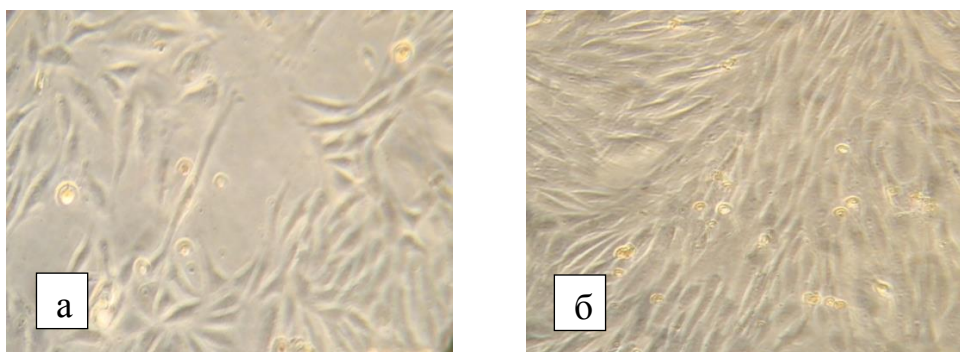


Рис. 1. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку кроля на нульовому пасажі культивування: а – клітини контрольної групи; б – клітини дослідної групи

На 10 добу культивування колонії клітин дослідної групи в чашках Петрі досягали значних розмірів, що частково призводило до їх злиття та утворення суцільного моношару, чого не спостерігалось в культуральних чашках із клітинами контрольної групи. Разом з тим на 10 добу культивування в чашках Петрі, в які додавали сироватку крові коня, експансія клітин становила близько 90-95%, тоді як у чашках зі стандартним культуральним середовищем – близько 65-70 %. Підрахунок клітин на 0 пасажі виявив достовірно більшу їх кількість у культуральних чашках контрольної групи клітин на 24,3 % більше порівняно з культуральними чашками контрольної групи клітин (табл. 1, рис. 1).

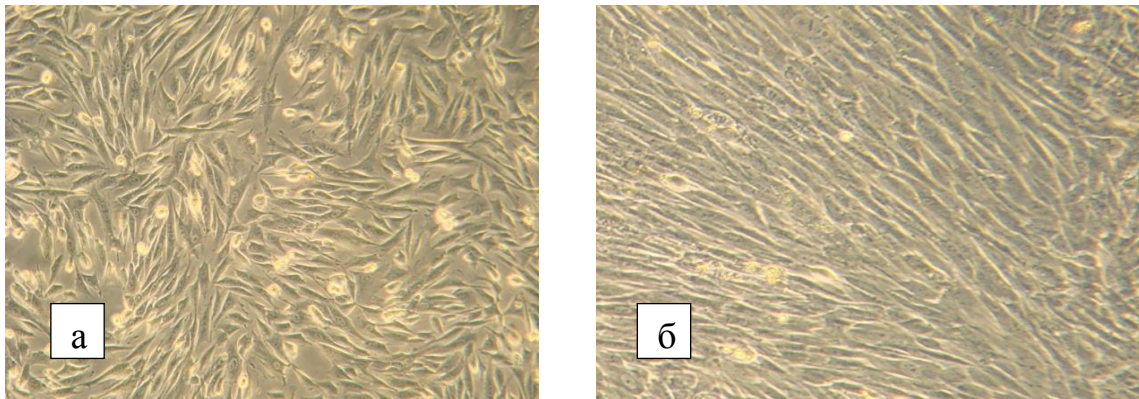


Рис. 2. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку кроля на першому пасажі культивування: а – клітини контрольної групи; б – клітини дослідної групи

На 5 добу культивування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля першого пасажу було встановлено, що клітини в культуральних чашках із сироваткою крові коня (клітини дослідної групи) утворили моношар і їх кількість становила 90,6 тис/см², тоді як у культуральних чашках без цієї сироватки (клітини контрольної групи) моношар складав лише 50-60 % і кількість клітин становила 55,5 тис/см². Таким чином, кількість клітин дослідної групи першого пасажу на 5 добу культивування на 38,7 % перевищувала кількість клітин у культуральних чашках контрольної групи (табл. 1, рис. 2).

Отже, культивування стовбурових клітин кроля в присутності сироватки крові коня призводить до активної адгезії та активної проліферації клітин кісткового мозку. Підвищення клоногенної і проліферативної активності недиференційованих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля, очевидно, відбувається за рахунок наявності в сироватці крові коня цитокінів, які активують маркери проліферації культивуємих клітин, що, в свою чергу, доводить можливість часткової заміни ембріональної телячої сироватки на сироватку крові коня.

Висновки. Склад культурального середовища суттєво впливає на колонієформуєчу та проліферативну активність клітин. Часткова заміна ембріональної сироватки телят на сироватку крові коня підвищує адгезивні та проліферативні властивості мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку кроля, що є важливим фактором за часткової заміни ембріональної телячої сироватки на сироватку крові коня.

Список літератури

1. Кухарчук А. П. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника / А. П. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман. – Черновцы: Золоті литаври, 2004. – 505 с.
2. Нимер Н. С. Стволовые клетки (Обзор литературы) / Н С. Нимер // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – № 1. – С. 46-51.
3. Патент на корисну модель «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин» / А. Й. Мазуркевич, М. О. Малюк, С. М. Ткаченко, Ю. О. Харкевич; заявник Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. – № 86839; заявл. 25.07.2013; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1.
4. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue / S. Bonner-Weir, M. Taneja, G. C. Weir [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, N 14. – P. 7999-8004.
5. Friedenstein A. J. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs / A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, N. N. Kulagina // Exp. Hematol. – 1976. – Vol. 4, N 5. – P. 267-274.
6. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy / C. Jorgensen, F. Djouad, F. Apparailly, D. Noël // Gene Ther. – 2003. – Vol. 10, N 10. – P. 928-931.

7. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation / D. G. Phinney, G. Kopen, R. L. Isaacson, D. J. Prockop // J. Cell. Biochem. – 1999. – Vol.72, N 4. – P. 570-585.

8. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck [et al.] // Science. – 1999. – Vol. 284, N 5411. – P. 143–147.

References

1. Kukharchuk A. P., Radchenko V.V., Syrman V.M. (2004). Stvolovye kletki: jeksperiment, teorija, klinika [Stem cells: experiment, theory, clinic]. Chernivtsi, Ukraine: Gold timpani, 505.

2. Nimer N.S. (2009). Stvolovye kletki (Obzor literatury) [Stem cells (Literature Review)]. Health and environmental problems, 1, 46 – 51.

3. Mazurkevych A.I., Maliuk M. O., Tkachenko S.M., Kharkevych Iu. O. (2014). The method of obtaining bone marrow in vivo in small animals. Patent of Ukraine for useful model. № 86839; declared 25.07.2013; published 10.01.2014, №1.

4. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G. C. [et al.]. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97 (14), 7999-8004. 9

5. Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Experimental Hematology, 4 (5), 267-274.

6. Jorgensen C., Djouad F., Apparailly F., Noël D. (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. Gene Therapy, 10 (10), 928-931.

7. Phinney D. G., Kopen G., Isaacson R. L., Prockop D. J. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. Journal of Cellular Biochemistry, 72 (4), 570-585.

8. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. [et al.]. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284 (5411), 143–147.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ СЫВОРОТОК РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛОНИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ

Е. А. Москалёва, Н. А. Малюк

Аннотация. Установлено, что культивирование стволовых клеток костного мозга кролика в присутствии сыворотки крови лошади приводит к активной адгезии и пролиферации этих клеток. Увеличение клоногенной и пролиферативной активности недифференцированных мезенхимальных

стволовых клеток костного мозга кролика, очевидно, происходит за счет наличия в сыворотке крови лошади цитокинов, которые выводят из дорматного состояния культивируемые клетки на нулевом пассаже. А также активируют маркеры пролиферации этих клеток, что, в свою очередь, доказывает возможность частичной замены эмбриональной телячьей сыворотки на сыворотку крови лошади.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, пролиферация, эмбриональная сыворотка телят, сыворотка крови лошади

INFLUENCE OF SERUMS COMBINATION OF DIFFERENT ANIMALS SPECIES ON EFFICIENCY OF CLONING OF PRIMARY MULTIPOTENTIAL STEM CELLS OF RABBIT'S BONE MARROW

K. Moskalova, M. Maliuk

Abstract. *It is educed, that cultivating of stem cells of the bone marrow of the rabbit with presence of horse`s serum, causes active adhesion and proliferation of these cells. Increasing of clonogenic and proliferative activity of undifferentiated mesenchymal stem cells of bone marrow of the rabbit, obviously, takes place due to the presence in horse`s serum of cytokines that withdraw cells from the dormant state and cultivate cells at zero passage; cytokines also activate markers of proliferation of such cells and it proves the possibility of partial replacement of fetal bovine`s serum to horse`s serum.*

Keywords: *mesenchymal stem cells, bone marrow, proliferation, fetal bovine serum, horse serum*