

**ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЩУРА ЗА ВПЛИВУ КУЛЬТУРАЛЬНОГО
СЕРЕДОВИЩА**

В. В. КОВПАК, кандидат ветеринарних наук,

О. С. КОВПАК, аспірант*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: vitkovpak@mail.ru, kovpak88-87@gmail.com

***Анотація.** Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), відомі також як стромальні клітини кісткового мозку, є плюрипотентною популяцією стовбурових клітин дорослого організму. Отримані результати доклінічних та клінічних випробувань, свідчать про високу ефективність МСК за використання в якості замісної терапії, у порівнянні з іншими методами лікування.*

Досліджено вплив трьох різних за складом культуральних середовищ на проліферативну активність МСК та виявлено оптимальне з них.

Доведено, що мезенхімальні стовбурові клітини здатні до направленої диференціації у кардіоміогенному напрямі під дією транскрипційного фактору 5-азацитидину. Отримані дані підтверджували морфологічною оцінкою культури та її дослідженням на молекулярному рівні.

***Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, проліферація, культуральне середовище, диференціація*

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) представляють собою резерв для регенерації тканин дорослого організму. Здатність МСК диференціюватися в різноманітні типи клітин визначають їх особливу цінність для біотехнології, клітинної біології та регенеративної медицини [3, 4, 8, 9]. Джерелом виділення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) є кістковий мозок, жирова тканина, пуповинна кров, амніотична рідина [5, 7].

Використання здатності стовбурових клітин до заміщення в організмі пошкоджених клітин і тканинних структур та відновлення їх функції лежить в основі розробки методів клітинної терапії.

* Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор А. Й. Мазуркевич

Проте питання щодо використання МСК висвітлено недостатньо, зокрема до цього часу не підібрані оптимальні умови культивування, до кінця не встановлений вплив різних чинників на проліферацію і диференціювання цих клітин. На наш погляд це стримує розвиток клітинної терапії у ветеринарній медицині і є великою прогалиною у науці, оскільки знання щодо особливостей стовбурових клітин мають не тільки загальнобіологічне, а й конкретне практичне значення для розвитку нового потужного напрямку в сучасній медицині.

Мета дослідження – встановити проліферативну активність МСК залежно від виду використовуваних різних культуральних середовищ та дослідити здатність мезенхімальних стовбурових клітин диференціюватися у кардіоміогенному напрямі під впливом екзогенних чинників.

Матеріали і методи дослідження. Експерименти проведені на тваринах із дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), Загальних етичних експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

З цією метою в експериментах були використані білі не лінійні щуренята 12-денного віку. Досліди *in vitro* проведені за наступною схемою наведеною на рисунку 1.

Мезенхімальні стовбурові клітини отримували з кісткового мозку стегнових та великогомілкових кісток 12-добових щурів, для цього після евтаназії тварин (шляхом декапітації під ефірним наркозом) від кісток відділяли епіфізи за допомогою шприца, наповненого фосфатно-буферним розчином ("Sigma", США), вимивали вміст кістково-мозкової порожнини, центрифугували протягом 5 хв за відцентрової силі 300 g. Зливали надосадову рідину, до осаду клітин додавали поживне середовище.

Одержану клітинну масу культивували в стандартному середовищі: 80 % – середовище Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM); 20 % – фетальна сироватка телят (FBS); 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика ("Sigma", США).

Культивування проводили у CO₂ інкубаторі за температури 37 °С та 5 % концентрації CO₂, до утворення моношару 90-100 %. Після отримання на 16 день моношару клітини знімали з культурального посуду за допомогою стандартного розчину трипсин/ЕДТА, центрифугували, а осад пересаджували [2, 6].

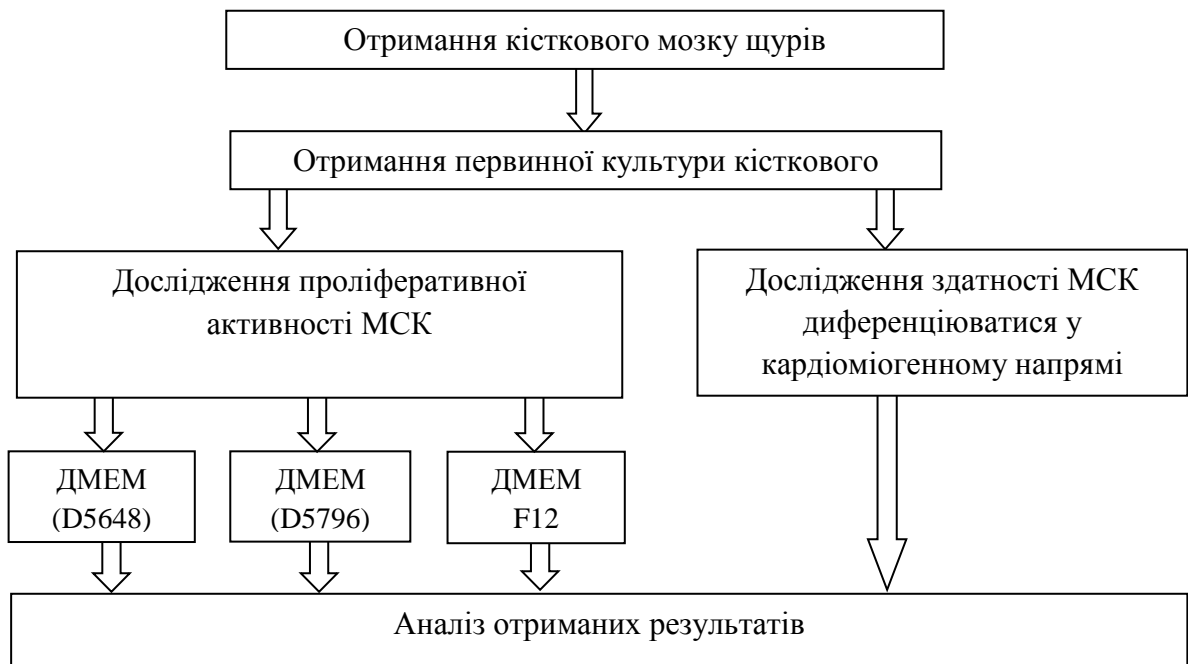


Рис. 1. Схема дослідження властивостей мезенхімальних стовбурових клітин

Для визначення оптимальних умов культивування осад клітин переносили у три різні за складом культуральні середовища. З метою визначення найбільш ефективного з наведених нижче середовищ за індексом проліферації клітини пересаджували в кількості 400 тис/чашку (посадкова щільність 44 тис/см²) для кожного культурального середовища:

1. ДМЕМ (D5648; SIGMA США) та ЕСТ – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³ (n = 3);
2. ДМЕМ (D5796; SIGMA США) та ЕСТ – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³ (n = 3);

3. ДМЕМ F12 (D8437; SIGMA США) та ЕСТ – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³ (n = 3).

Визначення кількості клітин здійснювали на 3 добу культивування після утворення в одній із чашок моношару. Підрахунок їх кількості здійснювали у лічильній камері Горяєва.

Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Для індукції диференціації МСК в кардіоміогенному напрямі, стовбурові клітини культивували в стандартних умовах до формування моношару 50-60 %, після чого до стандартного культурального середовища додавали 3 мкМ 5-азацитидину (Sigma, США). Обробка 5-азацитидином тривала 3 тижні, половину культурального середовища замінювали на нове кожні 3 доби. Мікроскопію культур клітин та фотозйомку проводили на інвертованому мікроскопі PrimoVert (Німеччина) [1].

Результати досліджень та їх обговорення. Як відомо, однією з властивостей МСК є здатність формувати колонії за низької щільності пасажування. Для дослідження цієї здатності суспензію клітин кісткового мозку висівали в чашки Петрі за щільності мононуклеарних клітини 5 тис/см² площі культурального посуду. Нами було встановлено, що за умов, описаних вище, клітини мали високу здатність до формування колоній *in vitro* (рис. 2).

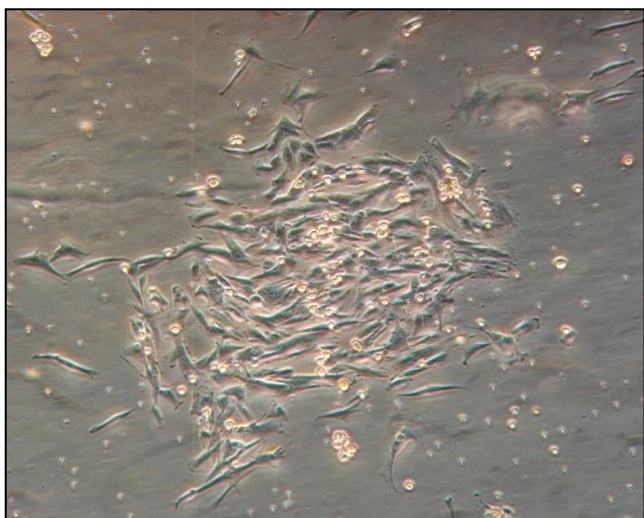


Рис. 2. Формування колоній МСК *in vitro*, 9 доба культивування. Нативний препарат 10x10

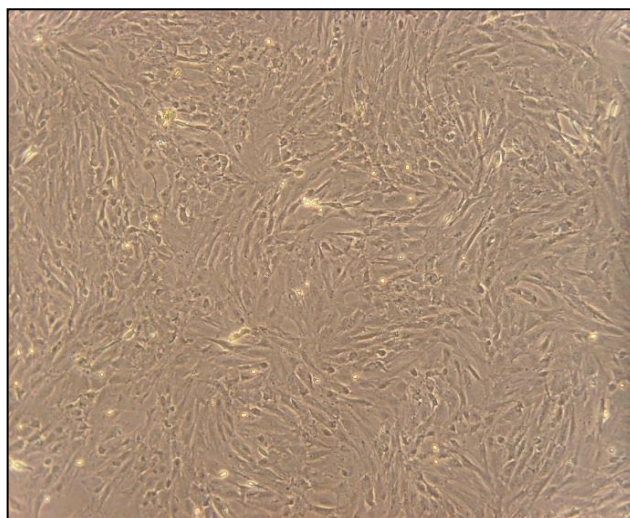


Рис. 3. Моношар клітин, 16 доба культивування (0 пасаж). Нативний препарат. 10x5

На 15-20 добу з початку культивування відмічали злиття між собою окремих колоній та утворення моношару (рис. 3). Клітини мають веретеноподібну форму, щільно розміщені в культурі, активність їх поділу сповільнюється.

Наступним етапом наших досліджень було визначити проліферативну активність МСК залежно від використовуваного культурального середовища. Результати досліджень наведені у таблиці 1.

1. Проліферативна активність МСК щура за впливу різних культуральних середовищ ($M \pm m$, $n = 3$)

Показники	DMEM (D5648)	DMEM (D5796)	DMEM F12 (D8437)
К-ть клітин (3 доба)	568±8 тис.	695±17тис.**	908±18тис.***
Індекс проліферації	1,42	1,74	2,27

$M \pm m$, $n=3$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

Як видно з наведених рисунків, в результаті культивування МСК щільність їх моношару залежно від виду культурального середовища мав свої особливості.

Так, у першому культуральному середовищі моношар не щільний, клітини великих розмірів, сильно розпластані (рис. 4).

Результати аналізу моношару культури відповідають тим, що отримані після підрахунку клітин. Таким чином, культуральне середовище DMEM (D5648) та EST – 20 % із додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³ за культивування МСК щура показує низьку ефективність.

Культивування МСК щура в другому культуральному середовищі проводилось із збереженням ідентичності умов.

В результаті було виявлено, що клітини більш густо вкривають дно культурального посуду, вони менших розмірів, що свідчить про вищий рівень проліферації клітин, ніж у першій групі (рис. 5)

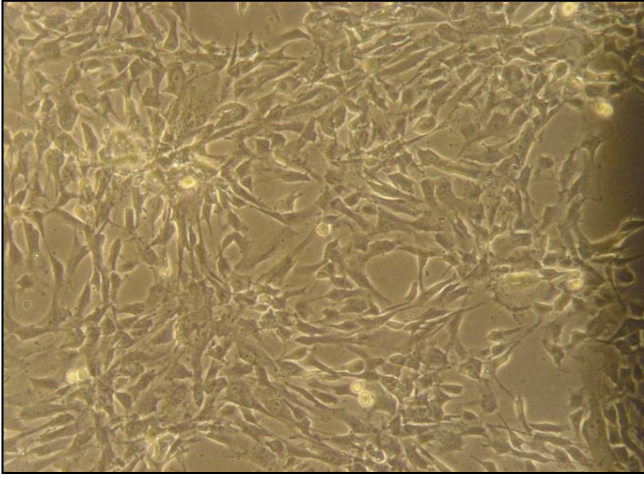


Рис. 4. Мікрофотографія моношару клітин, 3 доба культивування (1 пасаж), дослід 1 (середовище ДМЕМ - D5648). Нативний препарат. ок.×10, об.×10

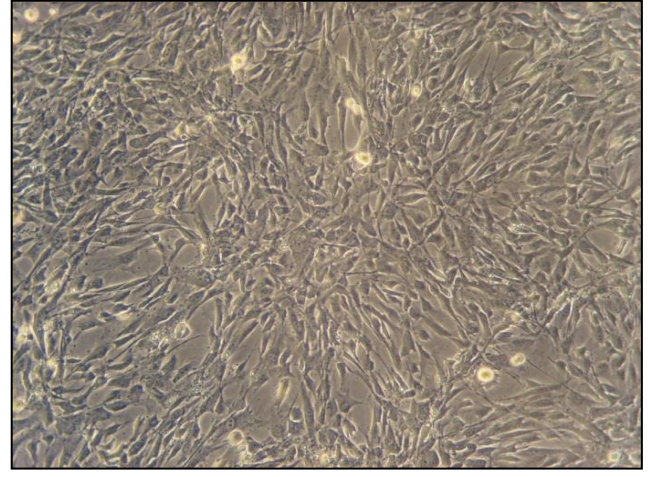


Рис. 5. Мікрофотографія моношару клітин, 3 доба культивування (1 пасаж), дослід 2 (середовище ДМЕМ - D5796). Нативний препарат. ок.×10, об.×10

Зокрема, в другій групі відмічено вищий рівень проліферації в порівнянні з першою. Проте варто відмітити, що дане культуральне середовище також виявилось не оптимальним.

В результаті культивування МСК із збереженням аналогічних умов культивування в третьому середовищі, на 3 добу культивування відмічено утворення щільного моношару, причому клітини залишалися невеликого розміру, що свідчить про збереження потенціалу до ділення (рис.6).

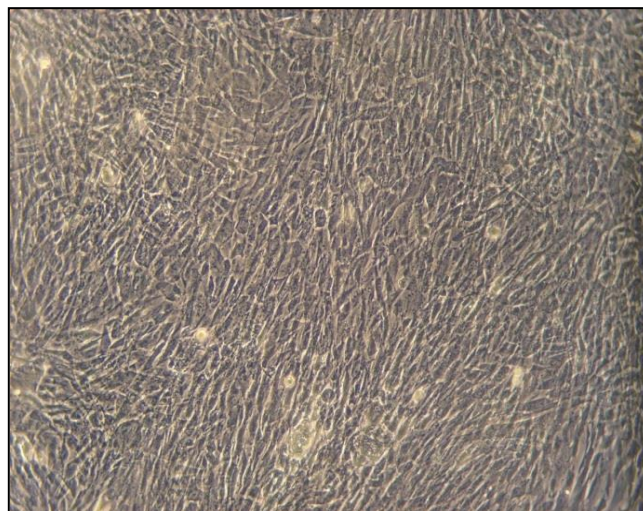


Рис.6. Мікрофотографія моношару клітин, 3 доба культивування (1 пасаж), дослід 3 (середовище ДМЕМ F12 - D8437). Нативний препарат. ок.×10, об.×10

Отже, культивування МСК щура в ДМЕМ F12 (D8437) та ЕСТ – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³ забезпечує найвищу проліферативну активність.

Наступним завданням, було дослідження здатності МСК диференціюватися в кардіоміогенному напрямі за впливу екзогенних чинників. Морфологічним критерієм оцінки диференціації МСК в кардіоміогенному напрямі було виявлення на 6-7 добу від початку спрямованої диференціації зміни морфології клітин. Встановлено, що цьому етапі клітини втрачали веретеноподібну і набували більш округлу форму, знижувалась їх проліферативна активність.

Виявлення диференціації МСК здійснювали на молекулярному рівні за допомогою моноклональних антитіл (контролювали експресію клітинами специфічного для кардіоміоцитів білка кардіотропоніну). Так на 9-12 добу з початку направленої диференціації встановлено високий рівень експресії кардіотропоніну (яскраво зелене свічення) (рис. 7 а), що підтверджує наявність процесів диференціації МСК у кардіоміогенному напрямі. У клітин, які не піддавалися впливу 5-азацитидину (контроль), рівень експресії кардіотропоніну залишається низьким (відсутність свічення).

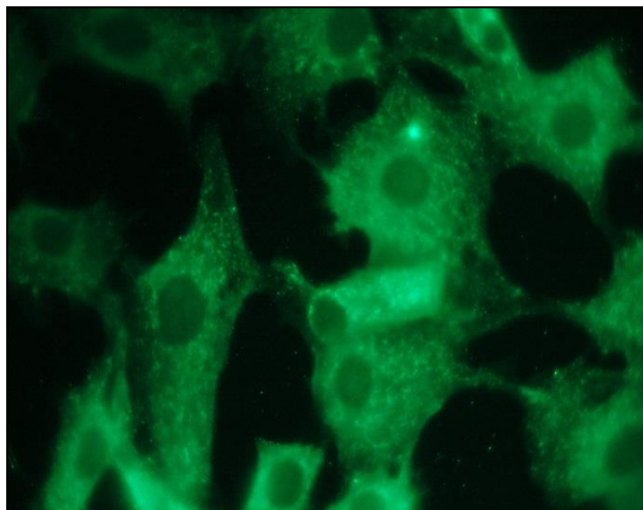


Рис. 7. Флюорисцентна мікроскопія. Виявлення кардіотропоніну після індукції диференціації МСК у кардіоміогенному напрямі. ок.×10; об.×100

Крім того, під мікроскопом мезенхімальні стовбурові клітини, диференційовані в кардіоміоцити, на 19-22 добу від початку направленої диференціації в окремих ділянках моношару скорочувались ритмічно, але не синхронно, що є підтвердженням приналежності популяції досліджуваних клітин до кардіоміоцитів.

Висновки

1. Культивування МСК щура в ДМЕМ F12 (D8437) та ЕСТ – 20 % з додаванням антибіотика-антимікотика 10 мкл/см³ забезпечує найвищу їх проліферативну активність.
2. Мезенхімальні стовбурові клітини здатні до направленої диференціації в кардіоміогенному напрям під дією транскрипційного фактору 5-азацитидину.

Список літератури

1. Галанкин В. Н. К вопросу о митотическом делении мышечных клеток сердца / Галанкин В. Н. // Архив патологии. – 1975. – Т. 37. – № 2. – С. 34-44.
2. Клітинні технології у ветеринарній медицині. Навчальний посібник / Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. [та ін.] – К.: КОМПРИНТ, 2014. – 132с.
3. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy // Exp. Hematol. — 2000. — V. 28, N 6. — P. 707–715.
4. Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E. Growth kinetics, selfrenewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell. Biochem. — 1997. — V. 64, N 2. — P. 278–294.
5. Campagnoli C. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C. Campagnoli, I.A. Roberts, S Kumar [et al.] // Blood. – 2001. – Vol.98. – P.2396-2402.

6. Culture of animal cells: a manual of basic techniques / Freshney R. Ian 5th ed.p.cm. – New Jersey: AJonH Wiley & Sons, Inc., Publication – 2005. – 642p.
7. Gronthos S. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells / S. Gronthos, D.M. Franklin, H.A. LeDy // J. Cell Physiol. -2001. — Vol.189. – P.54-63.
8. Le Blanc, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation // Biol. Blood Marrow Transpl. — 2005. — V. 11. — P. 321–334.
9. Prockop D. J. Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues // Science. — 1997. — V. 276, N 5309. — P. 71–74.

References

1. Halankyn V. N. (1975) К вопросу о митотическом делении мышечных клеток сердца [On the question of the mitotic division of the muscle cells of the heart]. Arkhyv patolohyy, vol. 37, 2, 34-44. [in Russian]
2. Masurkewitsch A. J., Kowpak W. W., Danilow W. B. (2014) Klitinni tehnologii u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik [Cellular technology in veterinary medicine. Tutorial]. K.: KOMPRINT. [in Ukrainian]
3. Banfi A., Muraglia A., Dozin B. (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. Exp. Hematol, vol. 28, 6, 707–715. [in English]
4. Bruder S. P., Jaiswal N., Haynesworth S. E. (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J. Cell. Biochem, V. 64, 2, 278–294. [in English]
5. Campagnoli C., Roberts I. A., Kumar S. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood, 98, 2396-2402. [in English]

6. Freshney R. Ian (2005) Culture of animal cells: a manual of basic techniques. New Jersey: AJonH Wiley & Sons, Inc., Publication. [in English]
7. Gronthos S., Franklin D. M., Leddy H. A. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J. Cell Physiol, 189, 54-63. [in English]
8. Le Blanc, Ringden O. (2005) Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. Biol. Blood Marrow Transpl, 11, 321–334. [in English]
9. Prockop D. J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues. Science, vol. 276, 5309, 71–74. [in English]

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

В. В. Ковпак, О. С. Ковпак

Аннотация. Исследовано влияние трех, разных по составу, культуральных сред на пролиферативную активность МСК и выявлено оптимальное из них. Доказано, что мезенхимальные стволовые клетки способны к направленной дифференциации в кардиомиогенном направлении под действием транскрипционного фактора 5-азацитидина. Полученные данные подтверждены морфологической оценкой культуры и ее исследованием на молекулярном уровне.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, пролиферация, культуральная среда, дифференциация

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF RAT MESENCHYMAL STEM CELL AT INFLUENCE CULTURE MEDIUM

V. V. Kovpak, O. S. Kovpak

Abstract. Was investigated the influence three different composition culture medium on proliferative activity of MSCs. Was defined the better culture medium. Proved that mesenchymal stem cells are able of aimed differentiation at kardiomyogenic under the direction of transcription factor 5 azacytidine. The data confirmed the morphological assessment of culture and research at the molecular level.

Key words: *mesenchymal stem cells, proliferation, culture medium, differentiation*