

О. С. Коротков

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА
ПОЛУЧЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Научные руководители: канд.биол. наук, доц. В. А. Толстой¹,
науч. сотр. Е. А.Примакова²*

Кафедра биологии,

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

²МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск

A. S. Karatkou¹

**DETERMINATION OF THE MOST EFFECTIVE SOURCE OF PRODUCING
MESENCHYMAL STEM CELLS**

*Tutors: PhD in Biological sciences, Associate Professor N. A. Tolstoi¹,
Laboratory Researcher of Laboratory of Cell Technologies E.A. Primakova²*

Department of Biology,

¹Belarusian State Medical University, Minsk

²MSPC of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk

Резюме. В данном исследовании проводилось изучение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из тканей различной локализации. С целью определения наиболее эффективного источника получения МСК (жировая ткань паранефральной и параумбиликальной области, большой сальник, строма костного мозга) – сравнивались такие характеристики, как пролиферативный потенциал и продолжительность культивирования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), жировая ткань.

Resume. The study of mesenchymal stem cells (MSC), obtained from different tissues, was performed in this research. Such cell characteristics as cultivation time and their proliferative potential were compared in order to determine the most effective source of MSCs: paranephral and paraumbilical adipose tissue, omentum and bone marrow stroma.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSC), adipose tissue.

Актуальность. Открытие стволовых клеток считается одним из величайших достижений учёных в области биологии наравне с установлением структуры ДНК и расшифровкой человеческого генома. Вследствие их способности к дифференцировке в различные клеточные линии, стволовые клетки по сей день являются предметом исследований для оценки возможности их применения в терапии различных заболеваний [1].

На сегодняшний день МСК могут быть получены практически из всех тканей организма, однако одним из наиболее перспективных источников получения МСК считается жировая ткань (ЖТ) [2,3].

В данной работе для оценки наиболее эффективного источника МСК была дана сравнительная характеристика морфологических особенностей, а также пролиферативного потенциала МСК, полученных из 4-х анатомических зон (параумбиликальная и паранефральная ЖТ, большой сальник, строма костного мозга).

Цель: определить наиболее эффективный источник получения МСК.

Задачи:

1. Дать общую характеристику и показать клиническое значение МСК.
2. Произвести забор биологического материала, выделение и культивирование МСК человека.
3. Изучить морфологию и сравнить пролиферативный потенциал МСК различного происхождения.
4. Сделать вывод об эффективности различных источников получения МСК.

Материалы и методы. В ходе исследования на базе ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» проводилось изучение МСК различных анатомических зон: жировой ткани параумбиликальной (n=4) и паранефральной (n=4) локализации, большого сальника (n=4), а также стромы костного мозга (n=4).

Выделение МСК из костного мозга проводилось на градиенте плотности Histopaque-1,077 (SigmaAldrich, Германия). Выделение и культивирование МСК из жировой ткани и большого сальника выполнялось согласно действующим протоколам: клетки, полученные после ферментативной обработки ткани и центрифугирования, высевались в культуральные флаконы и выращивались в среде DMEM-LG (Gibco, UK) или MesenCult (StemCell, Канада) в CO₂-инкубаторе (+37°C, 5% CO₂, 90% влажность).

Выделение МСК из жировой ткани проводилось в несколько этапов. На первом этапе образцы жировой ткани промывались физиологическим раствором (рисунок 1А) и гомогенизировались с помощью ножниц (рисунок 1Б,В). Промывание физиологическим раствором производилось с целью облегчения процесса гомогенизации ткани.

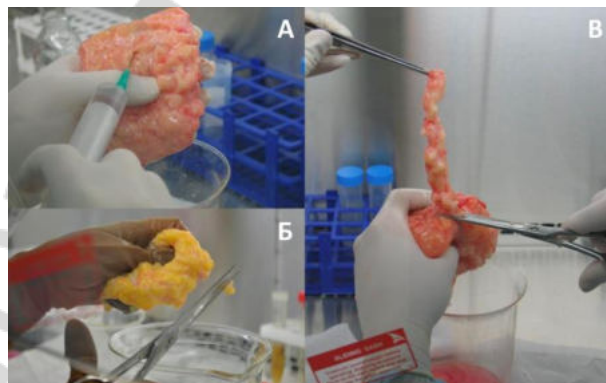


Рис.1 – Этапы подготовки жировой ткани к ферментативной обработке

Затем механически гомогенизованную жировую ткань трижды отмывали стерильным Phosphate Buffered Saline (PBS) для удаления клеточных дебрей и красных кровяных клеток, после чего инкубировали в течение 60 минут при температуре +37°C с 0,075% раствором коллагеназы I типа в PBS. Дальнейшая нейтрализация фермента проводилась с использованием среды Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС).

Клетки, полученные после ферментативной обработки, отмывались и на ночь помещались в культуральные флаконы (рисунок 2) со специализированной средой

для культивирования МСК (MesenCult). На следующий день флаконы интенсивно промывались стерильным PBS для удаления неадгезировавших клеток.

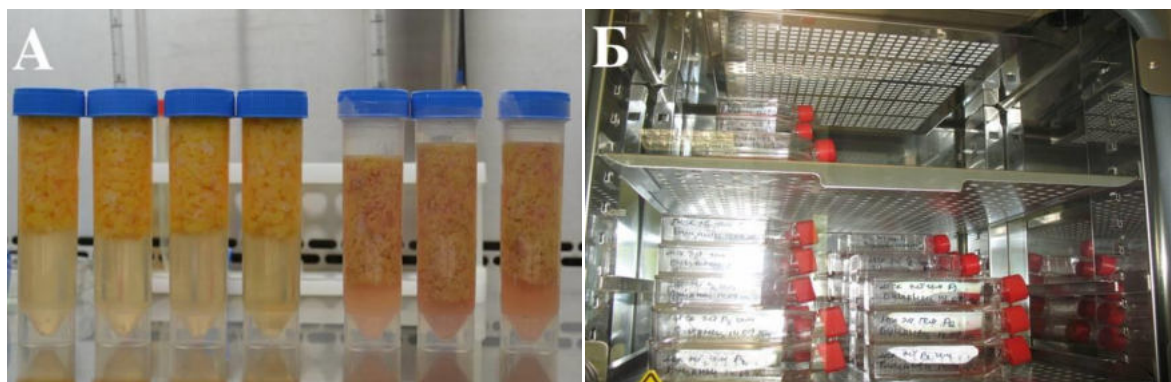


Рис.2 – Этапы выделения МСК из ЖТ. А – образцы до ферментативной обработки, Б – выделенные клетки во флаконах, помещённые в инкубатор

Полученную популяцию культивировали в специализированной среде MesenCult со 100% заменой последней каждые 3–4 дня. По достижении клетками 70–80% конфлюэнтности их обрабатывали раствором трипсин/ЭДТА, который затем нейтрализовали ингибитором трипсина.

Для подтверждения принадлежности культивируемых клеток к МСК был применён метод проточной цитофлуориметрии, а также метод инвертированной микроскопии с использованием фазового контраста.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследований было установлено, что МСК ЖТ параумбиликальной (рисунок 3А) и паранефральной (рисунок 3Б) локализации, а также МСК, полученные из костного мозга (рисунок 3В), имели аналогичную веретеновидную, фибробластоподобную морфологию. В монослое отмечалась специфическая направленность клеток с образованием так называемых «рыбьих косяков». Однако, при культивировании образцов, полученных из большого сальника, помимо МСК выделялись также клетки мезотелия (рисунок 3Г), поэтому сравнение данных образцов на предмет пролиферативной активности не проводилось.

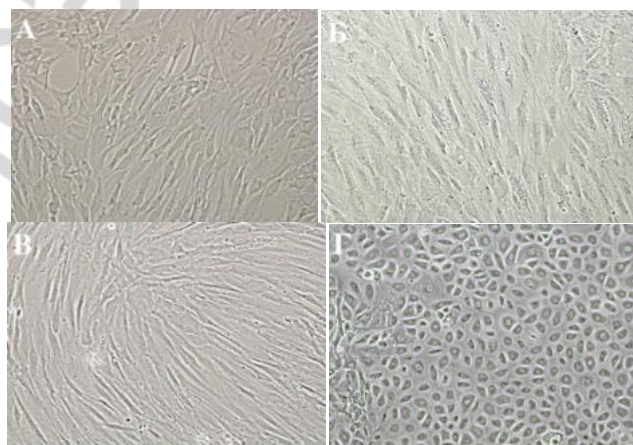


Рис.3 – Фотографии образцов различных культур МСК на стадии P₃-P₄

Параллельный рост стволовых клеток и клеток мезотелия в образцах, полученных из большого сальника, наблюдался уже на начальных этапах культивирования (рисунок 4).

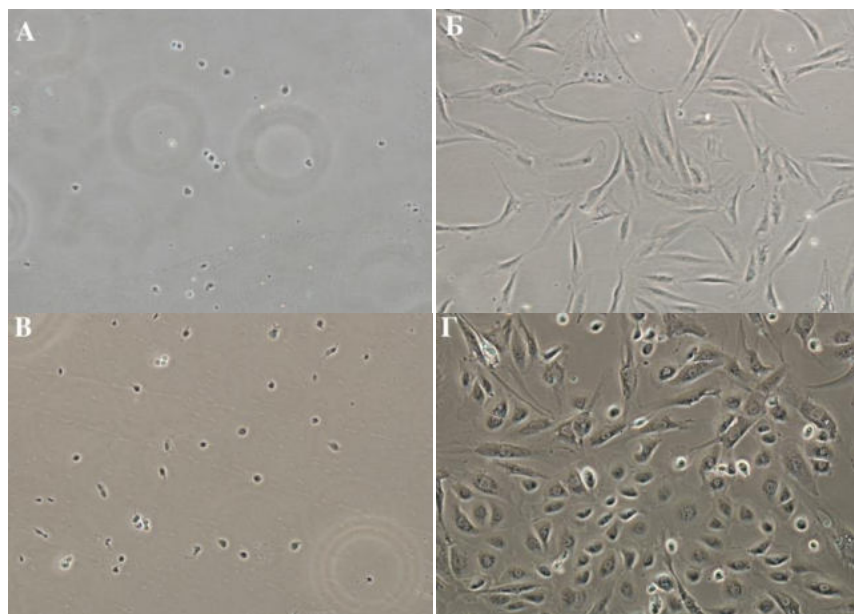


Рис.4 – Фотографии первичных культур МСК из жировой ткани и большого сальника

На рисунке 4 показаны первичные культуры МСК (P_0), полученные из ЖТ паранефральной локализации (А,Б) и из большого сальника (В,Г) на первый и шестой день нахождения в культуре. На фотографии Г можно отметить наличие двух различных клеточных типов – мезенхимальных стволовых клеток и мезотелиальных.

Суммарное время культивирования МСК из различных источников оказалось сопоставимым ($37,5 \pm 5,5$ дней). Однако следует отметить, что продолжительность культивирования на этапе P_0-P_1 (первичная культура) МСК ЖТ параумбиликальной локализации составила в среднем 18 ± 3 дней; на следующих пассажах продолжительность культивирования была сопоставима с аналогичным показателем для МСК ЖТ паранефральной локализации и МСК костного мозга (рисунок 1).

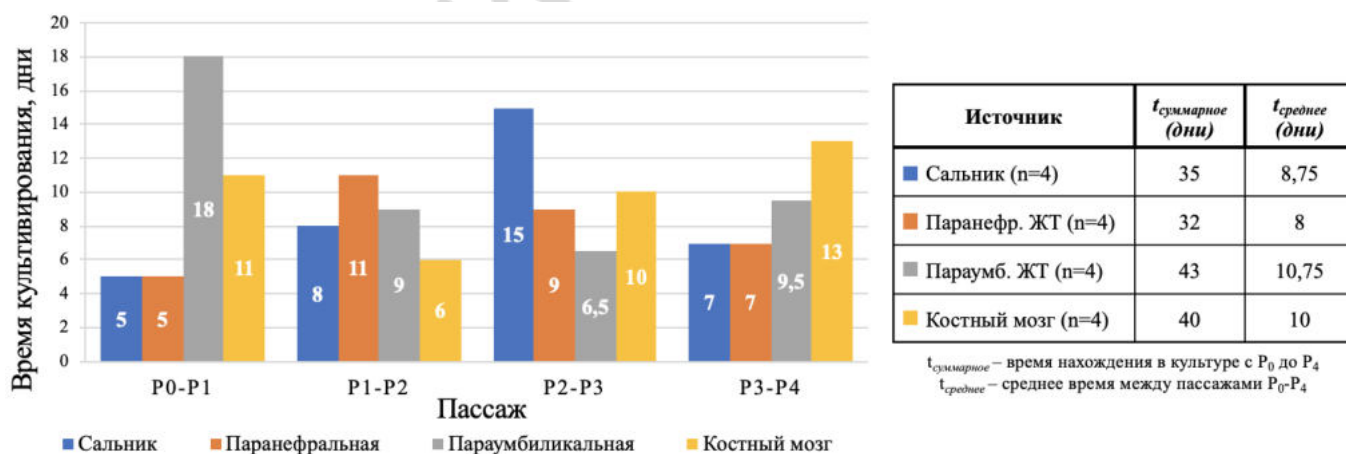


Рис.5– Сравнение сроков пребывания исследуемых образцов в культуре

Дальнейшее сравнение МСК проводилось на предмет пролиферативного потенциала. При сравнении количества клеток, полученных на различных пассажах, было установлено следующее (рисунок 6):

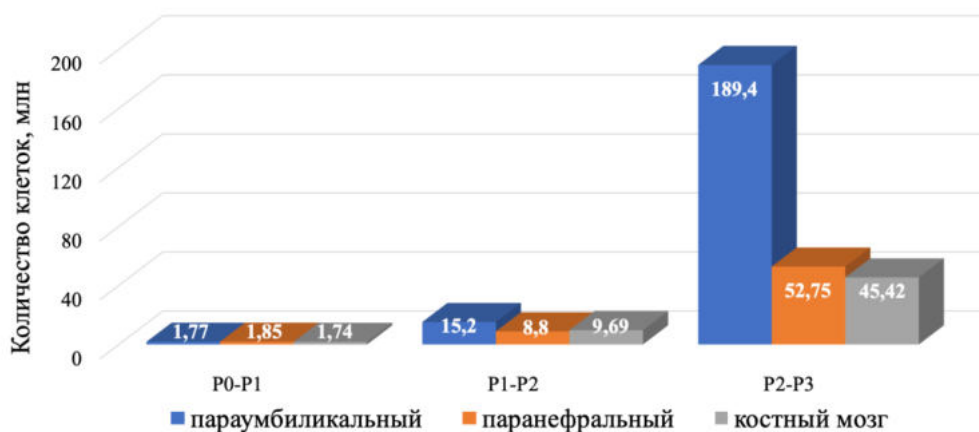


Рис.6 – Зависимость количества клеток в исследуемых образцах от пассажа

1. На начальном этапе культивирования (P_0-P_1) не было выявлено значительных различий в количествах МСК, полученных в различных культурах.

2. На следующем этапе (P_1-P_2) при сопоставимых сроках культивирования отмечался больший клеточный прирост МСК ЖТ параумбиликальной локализации по сравнению с МСК ЖТ паранефральной локализации и МСК костного мозга в 1,7 и 1,56 раза соответственно.

3. Пролиферативный потенциал МСК ЖТ параумбиликальной локализации после третьего пассажа превышал аналогичный показатель для МСК ЖТ паранефральной локализации и МСК костного мозга в 3,6 и 4,2 раза соответственно.

Выводы:

1. Наиболее эффективным источником для получения МСК является жировая ткань параумбиликальной локализации.

2. Жировая ткань паранефральной локализации и строма костного мозга также могут быть использованы в качестве источников МСК, однако их пролиферативный потенциал несколько ниже.

3. Большой сальник непригоден в качестве источника МСК ввиду наличия примеси мезотелиальных клеток.

Литература

1. Шумаков, В.И. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В.И. Шумаков [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. – № 4. – С. 3-6.

2. Разработка и внедрение технологии совместной трансплантации мезенхимальных и аллогенных гемопоэтических стволовых клеток для терапии больных с патологией кроветворения: отчет о НИР (промежут.) / Республ. науч.-практ. центр гематологии и трансфузиологии; рук. темы Г.Я. Хулуп, А.Л. Усс, С.И. Кривенко. – М., 2006. – 18 с.

3. Петренко, А.Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А.Ю. Петренко, Э.Н. Иванов, Ю.А. Петренко // Биотехнология. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 39-48.