

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФЕНОТИПА И МОРФОЛОГИИ 3D И 2D КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Е.М. Ермоленко, Ж.А. Ибрагимова, М.П. Потаннев, Т.С. Колесникова, А.В. Гончарик

Белорусский Государственный медицинский университет

В последнее десятилетие в связи с бурным развитием фундаментальных исследований в области биологии открылись перспективы регенеративной медицины, основанной на использовании МСК (мезенхимальных стволовых клеток) самостоятельно или в составе биоинженерных конструкций (на различных 2D или 3D матриксах) [1, 2, 3].

В то время как внимание многих исследователей сконцентрировано на изучении влияния на МСК растворимых химических факторов, немаловажное значение имеет изучение использования 3D материалов [4, 5]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования различных органических и неорганических соединений с целью создания биосовместимых матриц, на основе которых можно культивировать и трансплантировать клетки (в том числе, стволовые) [6]. В частности известно, что гели альгината кальция могут быть использованы для инкапсуляции и регулируемой дифференцировки МСК [7].

При приготовлении тканевых трансплантатов необходимо наращивание клеточной биомассы *in vitro*, а также поддержание стабильного фенотипа клеток при их культивировании. Важным моментом является выбор материала для приготовления трансплантата. В своем исследовании мы использовали в качестве матрикса альгинатный гель.

Цель исследования: изучить влияние различных способов культивирования (в монослое — 2D и в альгинатном геле — 3D) на фенотип и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека.

Объект исследования: мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека, альгинатный матрикс.

Материалы и методы. Получение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Липоспират промывали раствором фосфатно-солевого буферного раствора с антибиотиками. После чего жировую ткань подвергали ферментированию раствором коллагеназы 0,075%. Выделенную клеточную фракцию отмывали в растворе ростовой среды DMEM с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков, после чего клетки высевали на культуральный пластик и культивировали на питательной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10мМ L-глутамин, антибиотиками.

Приготовление альгинатных матриксов. Для приготовления альгинатного раствора соль (в/о) (low viscosity, Sigma) растворяли в физиологическом растворе или культуральной среде (DMEM/F12, Lonza) на водяной бане при 37 °С в течение 30 минут.

Для приготовления альгинатных матриксов клетки были сняты с поверхности культуральных флаконов раствором трипсина\ЭДТА (Invitrogen). Количество клеток было подсчитано в камере Горяева, жизнеспособность оценена с помощью раствора трипанового синего 0,1% (Sigma), после чего клетки равномерно распределяли в объеме раствора.

Для полимеризации раствора альгината натрия использовали растворы, содержащие разные концентрации ионов кальция.

Культивирование инсталлированных в матриксный носитель МСК ЖТ. В течение всего периода культивирования (14 суток) в 3D-матриксе микроскопически исследовалась морфология и пролиферация МСК. Исследование проводилось с использованием микроскопа Olympus IX 51 и программы Olympus DP-Soft.

Оценка жизнеспособности инсталлированных в матриксный носитель МСК ЖТ. Жизнеспособность клеток (ЖСП) оценивали с помощью окрашивания и подсчета клеток в 0,1% растворе трипанового синего. Клетки извлекали из альгинатного матрикса путем деполимеризации

геля раствором цитрата натрия, после чего клетки отмывали с помощью центрифугирования. Количество клеток и ЖСП оценивалось в камере Горяева.

Проточная цитофлуориметрия. Исследование выполняли с использованием лазерного проточного цитофлуориметра Epics Altra (Швейцария). Клетки были сняты с культуральных флаконов 0,25% трипсином с ЭДТА. Клетки промывали в буфере для проточной цитофлуориметрии (ФСБ, 2% FBS, 0,2% Tween 20), затем инкубировали в течение 30 минут в буферном растворе для проточной цитофлуориметрии с добавлением FITC-конъюгированных антител к следующим CD-маркерам: 29, 44, 90, и TRITC-конъюгированных моноклональных антител к CD 105 (Beckman Coulter).

Результаты и их обсуждение. Для исследования были использованы матрицы, приготовленные на основе 2% альгината натрия, растворенного в 0,9% NaCl, в который были инсталлированы МСК. Для контроля использовали МСК ККМ, культивируемые в обычных условиях на пластике.

Матрицы с клетками помещали в полную питательную среду. Сравнительный морфологический анализ клеток проводился в течение всего периода культивирования (14 суток). В течение первых суток культивирования в трехмерной структуре клетки располагались поодиночке и имели сферическую морфологию (рисунок 1).

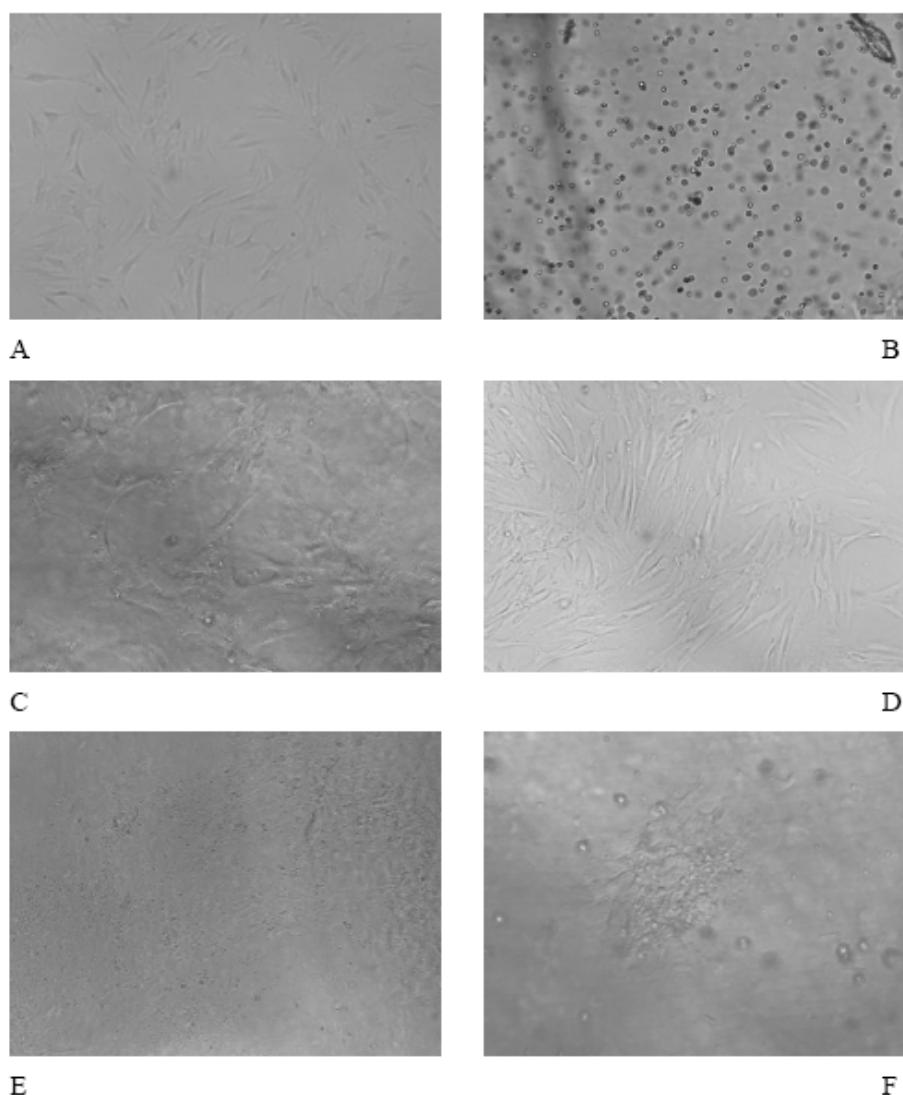


Рисунок 1 — Культуры МСК в альгинатном геле и культуральном пластике.

- А — 1-е сутки культивирования МСК на культуральном пластике, 10x
- В — 1-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0.9% NaCl, 50mM CaCl₂, 10x
- С — 3-и сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0.9% NaCl, 50mM CaCl₂, 40x
- Д — 3-и сутки культивирования МСК на культуральном пластике, 10x
- Е — 6-е сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0.9% NaCl, 50mM CaCl₂, 10x
- Ф — 3-и сутки культивирования МСК в альгинатном геле, приготовленном на 0.9% NaCl, 50mM CaCl₂, 40x

Начиная со 2-х суток культивирования, происходили изменения морфологии клеток в экспериментальных образцах: одновременно с округлыми клетками наблюдались вытянутые веретенообразные клетки фибробластоподобной формы. В контрольных образцах клетки имели обычную веретенообразную морфологию, монослой достигал 60% конfluence. На 4-е сутки культивирования клетки в объеме матрикса были распределены неравномерно, располагались слоями, группами, образовывали небольшие скопления. Контрольные образцы достигли 80% конfluence монослоя. К 6-м суткам весь объем матрикса был заполнен клетками, которые располагались слоями. Контрольные образцы достигли 100% конfluence монослоя.

Для оценки жизнеспособности на 6-е сутки альгинатный матрикс был деполимеризован цитратом натрия. После трехкратной отмывки клетки окрашивали 4% раствором трипанового синего и подсчитывали процент жизнеспособных клеток по сравнению с контролем. Так, контрольные (2D) образцы показали 99,9% ЖСП, в то время как опытные (инсталлированные в альгинатный носитель) — 90–95%.

Для сравнения пролиферативной активности контрольные (2D) и опытные (3D) образцы высевали в одинаковом количестве. По достижении монослойной культурой конfluence (6 сутки) клетки снимали с помощью трипсина и подсчитывали их количество в камере Горяева. Одновременно извлекали клетки из альгината путем деполимеризации и подсчитывали их количество. В ходе эксперимента оказалось, что пролиферативная активность клеток в условиях трехмерной структуры снижена на 15% по сравнению с контролем ($n=12$, где n — количество контрольных и экспериментальных чашек).

Одновременно сравнивался фенотип контрольных (2D) и опытных (3D) образцов. Все образцы были проинкубированы с антителами к CD44, CD29, CD90 и CD105. В условиях 2D культивирования количество МСК, позитивных по CD44 составляло $98,9 \pm 1,0\%$, по CD90 — $89,7 \pm 1,0\%$, по CD105 — $88,1 \pm 1,3\%$. Большинство клеток ($99,1 \pm 0,9\%$) окрашивалось с помощью FITC-меченых антител к CD29, что свидетельствует об их принадлежности к мезенхимальным стволовым клеткам. В ходе эксперимента было установлено, что МСК, культивируемые в трехмерной структуре показали сходные результаты по анализу фенотипа. Так, в 3D культуре количество клеток, позитивных по CD44, составляло $98,7 \pm 1,1\%$, по CD90 — $89,2 \pm 1,0\%$, по CD105 — $87,7 \pm 1,2\%$, CD 29 — $98,6 \pm 1,2\%$.

Выводы.

1. При сравнении 2D и 3D клеточных культур было обнаружено, что пролиферативный потенциал монослойной культуры на 15% выше, чем клеток, культивируемых в альгинатном матриксе. При этом жизнеспособность образцов отличалась незначительно: 99,9% ЖСП у МСК, культивируемых на пластике, в то время как 3D культуры показали 90–95% жизнеспособных клеток.

2. Сравнительный анализ CD маркеров МСК не выявил достоверных отличий между клетками, культивируемыми в разных условиях. Большинство клеток ($99,1 \pm 0,9\%$) окрашивалось с помощью FITC-меченых антител к CD29, что свидетельствует об их принадлежности к мезенхимальным стволовым клеткам. При 2D культивировании количество клеток, позитивных по CD44, составляло $98,9 \pm 1,0\%$, по CD90 — $89,7 \pm 1,0\%$, по CD105 — $88,1 \pm 1,3\%$. В 3D культуре количество клеток, позитивных по CD44 составляло $98,7 \pm 1,1\%$, по CD90 — $89,2 \pm 1,0\%$, по CD105 — $87,7 \pm 1,2\%$, CD29 — $98,6 \pm 1,2\%$.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PHENOTYPE AND MORPHOLOGY 3D AND 2D CELL CULTURES HUMAN MESENHIMAL STEM CELLS

E. M. Ermolenko, J. A. Ibragimova, M.P. Potapnev, T.S. Kolesnikova, A.V. Goncharik

It was compared proliferation and viability 2D and 3D cell culture human MSC and it was shown that proliferation potential and total viability of 2D culture higher then 3D culture. However, comparative analyses of phenotype haven't detected any reliable differences under analyses of surface CD markers MSC cultured in 2D and 3D medium.

Литература.

1. Шарифуллина С.З. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани – перспективный материал при моделировании хондрогенеза в трехмерных матриксах//Аллергология и иммунология. – 2006. – Т. 7. - №3. – С. 248.

2. Nakagami H, Morishita R, Maeda K et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 2006;13:77–81.
3. B Malafaya PP, Pedro AJ, Peterbauer A et al. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:1077–1085.
4. Рахматуллина Л.Р., Барышева Е.С., Рахматуллин Р.Р. Разработка клеточных биоматриц на основе гиалуроновой кислоты// *Успехи современного естествознания*. – 2010. – № 2 – С. 111-112.
5. Malafaya PP, Pedro AJ, Peterbauer A et al. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2005,16,1077–1085.
6. Viala X., Fotios M. Novel. Biomaterials for Cartilage Tissue Engineering Andreopoulos *Current Rheumatology Reviews*, 2009, 5, 51-57.
7. Kern, S. et al. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.