

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ КУЛЬТУРЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

НИИ экспериментальной и клинической медицины БГМУ, Минск, Беларусь
E-mail: ksv010613@gmail.com

Введение. В ходе развития клеточных технологий большой практический интерес представляет получение культур гладкомышечных клеток (ГМК), которые сохраняют во взрослом организме свой митотический потенциал. Процесс забора образцов, содержащих гладкомышечную ткань, высокоинвазивная процедура, поэтому важно подобрать оптимальные условия получения клеток с максимальным выходом их из ткани и высокой жизнеспособностью. Первичные культуры клеток могут быть получены путем миграции из фрагмента ткани (метод эксплантов) или ее ферментативной дезагрегации с последующим прикреплением клеток к субстрату. Однако применение данных методик может приводить к селекции клеток по их миграционной способности или по их устойчивости к протеазам.

Цель исследования – оценить эффективность методов механической и ферментативной диссоциации ткани аорты крыс для получения и экспансии культур гладкомышечных клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Гладкомышечные клетки выделяли из фрагментов аорты 10 белых рандомбредных крыс путем ферментативного расщепления тканей [1] или методом эксплантов [2] с некоторыми модификациями. После удаления наружной соединительнотканной оболочки аорты мышечный слой сосуда разрезали на два фрагмента длиной 0,8 см. Одну часть ткани подвергали инкубации в смеси ферментов (0,25 % коллагеназы I типа и 0,2 мг/мл эластазы (Sigma, США)) 20 или 40 мин с последующим посевом полученных мононуклеарных клеток в питательную среду. Второй образец мышечной стенки сосуда после механического измельчения на фрагменты 2–3 мм² экспантировали в питательной среде в культуральных чашках (метод эксплантов). Основу питательной среды составляла среда DMEM (Gibco, Великобритания), содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Lonza, Бельгия), 1 % антибиотика и 2 mM L-глутамин (Sigma, США). Для оценки апоптотической гибели клеток использовали флуоресцентный краситель – аннексин V-FITC

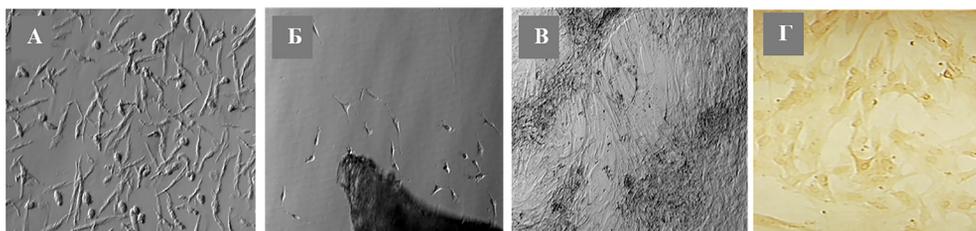
(R&D Systems, Канада). Экспрессию гладкомышечного α -актина исследовали методом иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител к белку (1 : 10, R&D Systems, Канада) и системы иммунопероксидазного окрашивания LSAB+System-HRP (Dako, США). При статистической обработке данных применяли непараметрический U -критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25–75-й процентиля).

Результаты и их обсуждение. Ферментативная обработка образца мышечной стенки аорты в течение 40 мин приводила к высвобождению отдельных округлых и веретеновидных клеток и позволяла получить $3,9 (3,0–4,7) \cdot 10^5$ ГМК (рисунок, А). Существенным недостатком данной методики являлась высокая степень повреждения клеток и активация в них апоптотических процессов. Доля апоптотических клеток составляла 46 (33–56) %. Снижение в 2 раза времени инкубации с ферментами, оказывающими при пролонгированном воздействии цитотоксический эффект, приводило к увеличению жизнеспособности клеточной фракции (14 (10–18) % апоптотических клеток), однако уменьшало концентрацию полученных ГМК ($1,8 (1,5–2,6) \cdot 10^5$ клеток).

При эксплантировании фрагментов ткани аорты крысы миграция отдельных миоцитов отмечалась только на 3-и–5-е сутки (рисунок, Б), что снижало темпы прироста первичной культуры на начальных этапах культивирования. Время достижения конfluence культур статистически значимо не отличалось от аналогичного показателя в культурах клеток, полученных ферментативным способом ($p > 0,05$).

Использование обеих методик выделения ГМК позволило получить культуры клеток с веретеновидной и фибробластоподобной морфологией (рисунок, В), высоким пролиферативным потенциалом, активно синтезирующие компоненты внеклеточного матрикса и экспрессирующие маркер гладкомышечных клеток – α -SMA (рисунок, Г).

Свойства полученных клеток, такие как «hills and valleys» морфология, митотическая активность и продукция компонентов внеклеточного матрикса,



Морфология первичной культуры ГМК аорты крысы (А – морфология ГМК после выделения ферментативным методом; Б – миграция клеток из экспланта, 5-е сутки культивирования;

В – образование «hills and valleys» в монослое ГМК;

Г – окрашивание ГМК моноклональными антителами к α -SMA). $\times 100$

характерны для ГМК секреторного фенотипа, у которых снижены сократительные функции. По мнению ряда исследователей, не исключается возможность перехода секреторного фенотипа в сократительный (снижение пролиферативного потенциала ГМК, миграционных способностей, переключение клеток на продукцию компонентов сократительного аппарата), однако для этого необходимо изменение условий микроокружения [3–5].

Выводы. Использование как метода эксплантов, так и метода ферментативной дезагрегации ткани аорты крыс позволяет получить *in vitro* гомогенные культуры гладкомышечных клеток секреторного фенотипа, характеризующиеся «hills and valleys» морфологией, высокой митотической активностью и продукцией компонентов внеклеточного матрикса. Метод эксплантов имеет сравнительное преимущество в использовании, так как позволяет в аналогичные по сравнению с ферментативным методом сроки культивирования получить первичные культуры ГМК без дополнительного цитотоксического воздействия ферментов.

Литература

1. Isolation, expansion and characterization of porcine urinary bladder smooth muscle cells for tissue engineering / M. Pokrywczynska [et al.] // Biol. Proc. Online. – 2016. – Vol. 18, N 1. – P. 1–17.
2. Mechanisms of aortic dissection smooth muscle cell phenotype switch / Z. An [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2017. – Vol. 154, N 5. – P. 1511–1521.
3. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: Implications for vascular / A. Jeffrey [et al.] // Tiss. Engineer. – 2010. – Vol. 16, N 5. – P. 467–491.
4. Targeting smooth muscle cell phenotypic switching in vascular disease / R. Chakraborty [et al.] // JVS-Vasc. Sci. – 2021. – Vol. 2. – P. 79–94.
5. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease / G. Cao [et al.] // Cell Commun. Signal. – 2022. – Vol. 20, N 1. – P. 1–22.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Совет молодых ученых

МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ 2024

Тезисы докладов
XXI Международной
научной конференции
молодых ученых
(Минск, 29—31 октября 2024 г.)

В двух частях

Часть 2

Медицинские,
физико-
математические,
физико-технические
науки,
химия
и науки о Земле

Минск
«Беларуская навука»
2024