

**БІОСУМІСНІСТЬ ДЕМІНЕРАЛІЗОВАНОГО КІСТКОВОГО
МАТРИКСУ ІЗ СТОVBУРОВИМИ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО
МОЗКУ КРОЛЯ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO***

Ю. В. ДЕМ'ЯНЦЕВА, магістр,

М. О. МАЛЮК, кандидат ветеринарних наук,

В. В. КОВПАК, кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: juliademianseva@gmail.com

Анотація. *Проведені експериментальні дослідження засвідчують, що епіфіз стегнової кістки кроля являється біосумісним матеріалом, який придатний для іммобілізації мультипотентних стовбурових клітин під час культивування in vitro і може бути використаний у якості біологічного матриксу на практиці. На кріозрізі епіфізу стегнової кістки кроля нами було встановлено, що клітини, які були мічені флуоресцентним барвником Хехст 33342, адгезувались до кістки і проявляли інтенсивне світіння, що свідчить про велику кількість стовбурових клітин, які на 5 добу культивування лишаються життєздатними і придатними для використання.*

Ключові слова: *мезенхімальні стовбурові клітини, кістковий мозок, епіфіз стегнової кістки, діафіз стегнової кістки, трансплантація, біоматрикс, біосумісність*

Оптимізація процесу відновлення дефектів кісткової тканини за допомогою клітинних технологій являється актуальною проблемою у ветеринарній медицині. Відомо, що відновлення дефектів кісткової тканини залишається в центрі уваги як фундаментальної науки, так і клінічної практики. В клінічній практиці проблему відновлення дефектів кісткової тканини в останній час пробують вирішити шляхом розробки і впровадження клітинно-регенеративної терапії із використанням біоматеріалів, які заповнюють втрачений об'єм кісткової тканини, і факторів, які покращують її репаративні властивості [2, 8].

Тканинна інженерія разом із мезенхімальними стовбуровими клітинами є однією з перспективних альтернатив та доповненням до вже

існуючих технологій для реконструкції кісткових дефектів. Стівбурові клітини кісткового мозку добре охарактеризовані за фенотипом і диференційним потенціалом, їх використання дозволяє прискорити заживлення переломів кісток на моделях у тварин [6, 9].

З метою підвищення ефективності відновлювальної дії мезенхімальних стівбурових клітин у місці їх застосування запропоновано цілий ряд методів. Вони полягають у попередній іммобілізації використовуваних мезенхімальних стівбурових клітин у тому або іншому носіїві. Вибір біоносіїв, в першу чергу, диктується особливостями патологічного процесу.

Порівняно нескладна методика отримання мезенхімальних стівбурових клітин (МСК) кісткового мозку, здатність цих клітин до розмноження *in vitro* і широкі потенції до цитодиференціювання роблять їх досить привабливими для терапевтичного застосування під час лікування тварин. Окрім цього, МСК володіють імуносупресивними властивостями, уникаючи тим самим відповіді імунокомпетентної системи тварини-реципієнта, що дозволяє їх використовувати не лише для алогенної та ксеногенної трансплантації, але і з метою пригнічення реакції «трансплантат проти господаря» [10].

Мезенхімальні стівбурові клітини, трансплантовані у ділянку ушкодження органу чи тканини, під впливом факторів мікрооточення набувають здатності до проліферації і диференціювання. Як наслідок, вони заміщують ушкоджені клітини, забезпечуючи тим самим заживлення дефекту.

Отже, вивчення біосумісності МСК із різними біоносіями під час культивування *in vitro* є актуальним завданням.

Мета дослідження – вивчити біосумісність декальцифікованої кісткової тканини із недиференційованими стівбуровими клітинами кісткового мозку кролів під час культивування *in vitro* з метою подальшого використання декальцифікованої кісткової тканини у якості біоносія для цих клітин.

Матеріали та методи дослідження. Мультипотентні стовбурові клітини одержували з кісткового мозку стегнової кістки кролів [5]. Дана процедура здійснюється під загальним наркозом шляхом внутрішньом'язового введення ксилазин-ацепромазинової суміші з розрахунку 3 мг ксилазину та 1 мг ацепромазину на 1 кг маси тіла тварини. Обробляли оперативне поле 5 % розчином йоду. В області дистально-латеральної ділянки стегна скальпелем розтинали пошарово шкіру, підшкірну клітковину та напружувач широкої фасції, утримуючи тканини рановим розширювачем. Тупим методом до кістки розшаровували головку двоголового та чотирьохголового м'язу. Отвір у кістці (ближче до дистального епіфізу) робили за допомогою хірургічного свердла діаметром 2-3 мм, під кутом 45 ° за відношенням до кістки для полегшення введення внутрішньосудинного катетеру відповідного діаметру. Водночас, катетер із голкою вводимо у кістково-мозговий канал проксимально до упирання в ендост, після чого голку виймали і за допомогою шприца із вмістом гепарину (2 – 3 ОД на 1 см³) аспірували вміст кістково-мозкового каналу, просовуючи катетер в проксимальному напрямку на всю його довжину [3] (рис. 1).

Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: DMEM – 80 %, сироватка ембріонів телят – 20 % (виробництва “Sigma”, США) з додаванням 10 мкл/см³ середовища антибіотика-антимікотика. Культивування проводили у CO₂-інкубаторі за 37 °C та 5 % концентрації CO₂. Водночас, МСК осідали, прикріплюючись до поверхні культуральних чашок Петрі і розпластувались. Суспензовану культуру гемопоетичних клітин згодом видаляли, після чого продовжували культивувати лише ті клітини, що мають адгезивні властивості. Після культивування отримували суспензію клітин, використовуючи 0,25/0,02 % розчин трипсину/ЕДТА [2]. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40.



Рис. 1. Аспірація кісткового мозку із кістково-мозкового каналу великогомілкової кістки кроля

Підрахунок кількості клітин проводили у камері із сіткою Горяєва. Загальну концентрацію клітин обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 1000}{0,9},$$

де: X - кількість клітин у 1 см³ досліджуваної суспензії;

A – кількість клітин, підрахованих у камері Горяєва;

1000 – кількість кубічних міліметрів у 1 см³;

0,9 – об'єм рахункової камери із сіткою Горяєва, мм³.

Загальну кількість клітин вираховували множенням отриманого числа «X» на об'єм досліджуваної клітинної суспензії.

Після отримання у процесі культивування відповідної кількості клітин, проводили їх культивування у присутності декальцифікованої стегнової кістки кролика (діафіз, епіфіз).

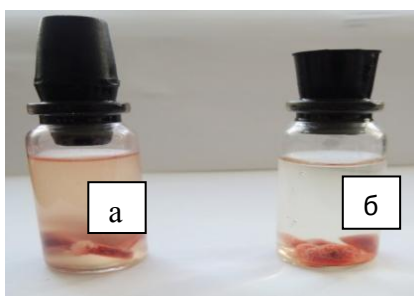


Рис. 2. Поміщений біоло-гічний матеріал в розчин дистильованої води з антибіотиком-антимікотиком (а-куряча, б-кроляча кістки)

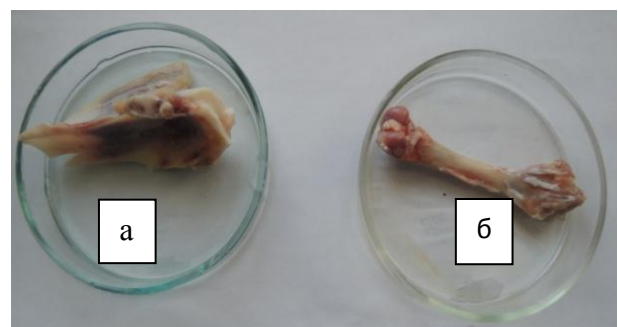


Рис. 3. Використаний матеріал: а - куряча грудна кістка; б- стегнова кістка

Одержаний біологічний матеріал (кістки) спочатку був поміщений у розчин дистильованої води з антибіотиком-антимікотиком 20 мкл на 1 мл (рис. 3).

Табл. 1. Проведення декальцифікації за двома методами та отримані результати протягом 4 діб

Матеріал	Стегнова кістка кроля (епіфіз і діафіз)		Куряча грудинна кістка	
До ба	5% HCl	EDTA	5% HCl	EDTA
1	без змін	без змін	без змін	без змін
2	спостерігаємо часткове розм'якшення	без змін	спостерігаємо часткове розм'якшення	без змін
3	більш виражене розм'якшення	без змін	більш виражене розм'якшення	без змін
4	м'яка	без змін	м'яка	без змін

В процесі експериментальних досліджень нами було проведено декальцифікацію курячої грудної кістки і епіфізу та діафізу стегнової кістки кролика за двома методами: з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) протягом 4 діб; із використанням соляної кислоти (HCl) протягом 4 діб (таб. 1, рис. 4) [1]. Після декальцифікації порівнювали отримані результати. Найбільш вдалий отриманий біологічний каркас був використаний для іммобілізації МСК, попередньо поміченими флуоресцентною речовиною Хехст 33342 [3].

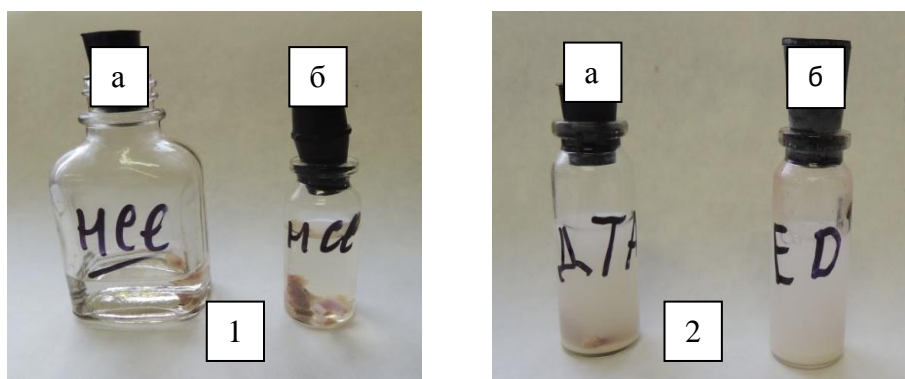


Рис. 4. Проведення декальцифікації кісткової тканини протягом 4 діб за допомогою: 1 – 0,5% соляної кислоти; 2 – етилендіамінтетраоцтової кислоти (а – кістка кроля , б-кістка курки)

Після проведеної декальцифікації отримані каркаси замочували у фосфатно-буферному розчині з додаванням антибіотика-антимікотика (20 мкл/1мл) протягом 1 доби для вимивання залишків речовин, які використовували для декальцифікації.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами встановлено, що методики, які були використані для декальцифікації проявили себе по різному. Розчин EDTA не є дієвим та ефективним, нами не отримано бажаного результату протягом 4 діб, жоден із зразків не підійшов нам для подальшого використання у нашому дослідженні. На противагу цьому, 5-й % розчин HCl виявився дієвим, досить швидким та ефективним, зразки, які піддалися декальцифікації за допомогою цього методу виявилися придатними для подальшого експерименту. Можна зробити висновок, що використання методики з EDTA є менш токсичним, але дуже тривалим в часі, водночас сама речовина погано розчинна, що є не зручним у використанні. На противагу цьому використання 5-й % HCl є більш дієвим та швидким, але більш токсичним, ніж у попередньому методі. Токсичності для стовбурових клітин ми позбулися попереднім замочуванням і промиванням нашого біоносія у фосфатно-буферному розчині.

Отримані каркаси з курячої грудної кістки та стегнової кістки кролика (діафіз, епіфіз) (рис. 5) були попередньо порівняні за своїми властивостями. Нами встановлено, що найкраще для каркасу підходить губчаста тканина, тобто епіфіз стегнової кістки. Діафіз, тобто трубчаста ділянка стегнової кістки, є не вдалим варіантом, оскільки для імобілізації клітинам необхідний такий каркас, який дозволить клітинам розміститися і фіксуватися рівномірно, що не може бути досягнуто в діафізі стегнової кістки.

Куряча кістка (грудина) також не може бути використана, в якості біоносій для МСК, тому що вона є занадто м'якою і декальцифікація не дає бажаних результатів.

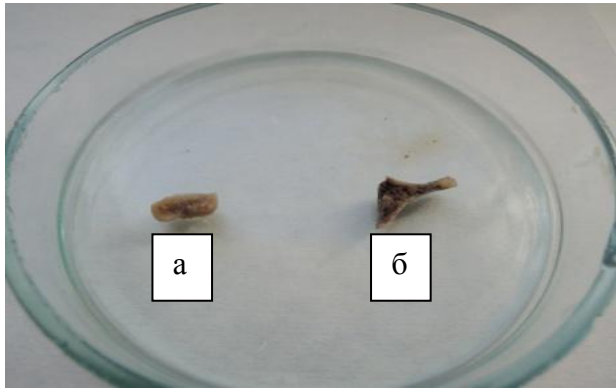


Рис. 5. Отримані каркаси кісткової тканини після декальцифікації 5 % HCl: а – стегнова кістка кроля; б- грудна кістка курки

Отже, отриманий каркас епіфізу стегнової кістки ми використали для іммобілізації МСК, попередньо міченими флуоресцентною речовиною Хехст 33342. Так, каркас епіфізу стегнової кістки після іммобілізації поміщали в живильне середовище із мезенхімальними стовбуровими клітинами кроля. На

п'яту добу культивування із дослідного матеріалу готували кріозрізи. Зразки кріозрізів досліджували під флуоресцентним мікроскопом. Водночас були виявлені живі МСК, які адгезувались до декальцифікованого каркасу кісткової тканини і проявляли світіння, що свідчить про життєздатність клітин (рис. 6). Інтенсивність світіння говорить про велику кількість стовбурових клітин, які на 5 добу культивування лишаються життєздатними і придатними для використання. Отже, декальцифікований епіфіз стегнової кістки є біосумісним матеріалом для стовбурових клітин.

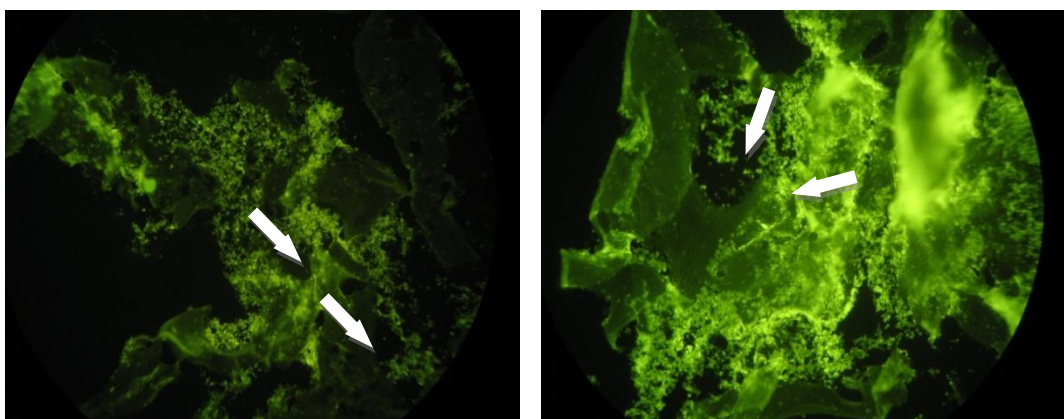


Рис. 6. Зразки кріозрізів досліджувані під флуоресцентним мікроскопом (стрілками показані живі клітини, які адгезувались до декальцифікованого каркасу кісткової тканини).

Висновки

1. Епіфіз стегнової кістки кроля є біосумісним матеріалом, який придатний для іммобілізації мультипотентних стовбурових клітин під час культивування *in vitro* і може бути використаний у якості біологічного матриксу на практиці.

2. Куряча кістка (грудина) не може бути використана в якості біоносія для МСК через особливості будови кістки, вона є занадто м'якою і декальцифікація не дає бажаних результатів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горальський Л. П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології/ Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. – Житомир: «ПОЛІССЯ».- 2005.- С. 22-25.

2. Лысенко Л. Н. Клеточные аспекты замещения дефектов костной ткани стеклокристаллическими материалами / Л. Н. Лысенко – Клиническая имплантология и стоматология. –2001.– №3-4.– С. 109-111.

3. Клітинні технології у ветеринарній медицині. / Мазуркевич А. Й., Ковпак В. В., Данілов В. Б. [та ін.]– Київ. КОМПРИНТ–2014.– С. 69-70, 87-88.

4. Використання мезенхімальних стовбурових клітин для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів: Методичні рекомендації / А. Й. Мазуркевич , В. Б. Данілов, М. О. Малюк М. [та ін.] – К., 2012. – С. 42.

5. Патент України на корисну модель № 40805. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин / Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ткаченко С. М., Ковпак В. В.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № у 2008 13659; заявл. 26.11.2008; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.

6. Паюшина О. В. Мезенхимальные стволовые клетки: источники, фенотип, дифференцировочные потенции / О.В. Паюшина, Е. И. Домарацкая, В. И. Старостян – Известия АН 2006. – №1. – С. 6 – 25.
7. Петренко А. Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю. А. Хунов, Э. Н. Иванов – Луганск.: Прес-экспресс, 20011. – 367с.
8. Фриденштейн А. Я. Стволовые остеогенные клетки костного мозга / А. Я. Фриденштейн // Онтогенез.– 1991.– № 2. С. 189–197.
9. Caplan A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine . J Cell Physiol – 2007;213 – . P. 341 – 347.
10. Keating A. Mesenchymal stromal cells / A. Keating // Curr. Opin. Hematol. – 2006. – Vol.13. – P. 419–425.

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

Ю. В. Демьянцева, М. О. Малюк, В. В. Ковпак

Аннотация. Проведенные экспериментальные исследования показывают, что эпифиз бедренной кости кролика является биосовместимым материалом, который пригоден для иммобилизации мультипотентных стволовых клеток при культивировании *in vitro* и может быть использован в качестве биологического матрикса на практике. На криосрезе эпифиза бедренной кости кролика нами было установлено, что клетки, меченые флуоресцентным красителем Хёхст 33342, адгезировались к кости и проявляли интенсивное свечение, что свидетельствует о большом количестве стволовых клеток, которые на 5 сутки культивирования остаются жизнеспособными и пригодными для использования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, эпифиз бедренной кости, диафиз бедренной кости, трансплантация, биоматрикс, биосовместимость

**BIOCOMPATIBILITY OF DEMINERALIZED BONE MATRIX
WITH BONE MARROW STEM CELLS OF RABBITS DURING
CULTIVATION *IN VITRO***

Yu. Demiantseva, M. Maliyk, V. Kovpak

***Abstract.** Experimental studies demonstrate that the rabbit's femoral epiphysis is a biocompatible material that is suitable for immobilization of multipotent stem cells during in vitro cultivation and can be used as a biological matrix in practice. In cryosection of rabbit's femoral epiphysis, we found that cells labeled with a fluorescent dye Hoechst 33342, adhered to the bone and showed intense glow, indicating a large number of stem cells in 5 days of cultivation remain viable and suitable for use.*

***Keywords:** mesenchymal stem cells, bone marrow, epiphysis femur, diaphysis femur, transplant, biomatrix, biocompatibility*