

УДК 612+614+616.9{579+612.012.1}(075.8)}

# Культивування стовбурових клітин пульпи зубів і мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку мишей з використанням автосироватки

## Autoserum Expansion of Mouse Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Сухіташвілі Н.<sup>1</sup>, Циклаурі М.<sup>1</sup>,  
 Зурмухташвілі М.<sup>1</sup>, Курашвілі Т.<sup>1</sup>,  
 Гогілашвілі К.<sup>1</sup>, Сабирбеков Б.<sup>2</sup>,  
 Менабде Г.<sup>1</sup>, Угрин М.<sup>3</sup>,  
 Аміранашвілі І.<sup>1</sup>, Абіатарі І.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут медичних досліджень,  
 Державний університет

ім. Іллі Чавчавадзе, Тбілісі, Грузія

<sup>2</sup>Департамент хірургії,  
 Мюнхенський технічний  
 університет, Німеччина

<sup>3</sup>Львівський національний  
 медичний університет ім. Данила

Галицького, Львів,

каф. ортопедичної стоматології  
 (зав. — проф. Р.М. Ступницький)

N. Sukhitashvili, M. Tsiklauri,

M. Zurmukhtashvili, T. Kurashvili,

K. Gogilashvili, B. Sabyrbekov,

G. Menabde, M. Ugrin,

I. Amiranashvili, I. Abiatar

**Резюме** Досліджено методи ізоляції та культивування стовбурових клітин пульпи зубів і мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку з використанням автосироватки. *In vitro* проведено дослідження ізольованих клітин, розглядалися їхній ріст, потенціал до формування колоній, проліферативна активність. Доведено, що при використанні автосироватки в середовищі для СКПЗ і СКМ збільшується проліферативна активність цих клітин, порівняно з використанням ФБС (фетальної бичачої сироватки). Окрім того, клітини, які культивувалися з використанням автосироватки, показали збільшення потенціалу до формування колоній після двох тижнів культивування.

**Summary** In this study we characterize isolation and autoserum expansion method for the mouse dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *In vitro* growth, colony forming efficiency and proliferation activity of these cells have been analyzed. Auto serum treatment of DPSC and BM-MSCs increased proliferation activity of these cells in comparison to FBS. Moreover, autoserum expanded cells displayed significantly increased colony forming efficacy after 2 weeks of culture.

**Ключові слова** стовбурові клітини пульпи зубів, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, автосироватка, проліферативна активність

**Key words** dental pulp stem cells, bone marrow mesenchymal stem cells, autoserum, proliferation activity

### Вступ

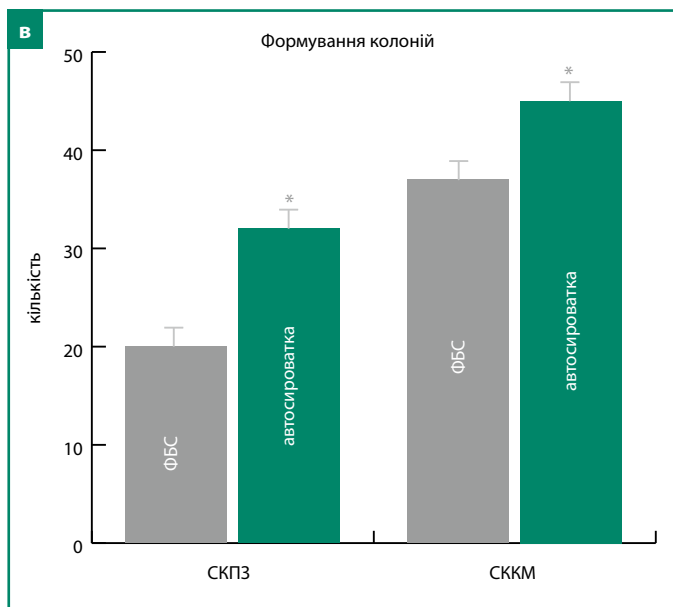
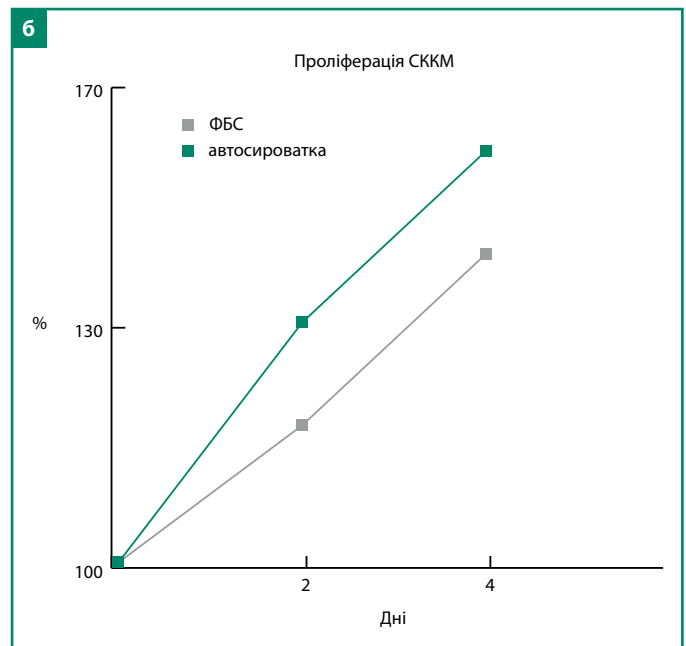
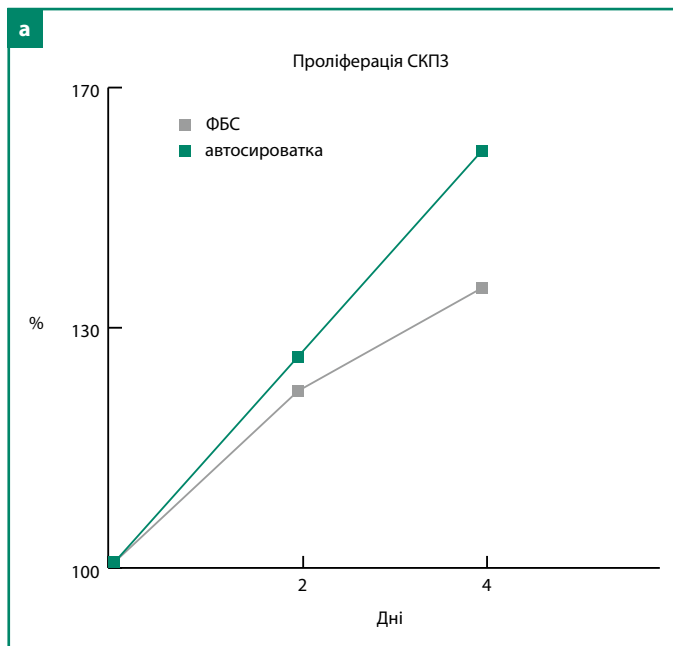
Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) наявні у багатьох тканинах, зокрема у кістковому мозку, жировій тканині та периферійній крові. Вони здатні диференціюватися у різні клітини мезодермального походження, такі як остеоцити, хондроцити і адипоцити [1-3]. Однак недавні дослідження показали, що МСК можуть трансдиференціюватися всупереч ембріональним обмеженням і в

клітини немезодермального походження: гепатоцити, ендотелеоцити і нейрони як у пробірці, так і в природних умовах [4, 5].

Незважаючи на те, що кістковий мозок є відмінним джерелом стовбурових клітин, які мають терапевтичне значення, однак процес забору кісткового мозку є інвазійним. Виявлення стовбурових клітин у пульпі зуба уможливило потенційно неінвазійне джерело їх забору. Стовбурові клітини пульпи зуба

(СКПЗ) розташовані у межах зуба та відіграють важливу роль у регенерації дентину. Відкриття СКПЗ викликало інтерес дослідників в аспекті їхнього клінічного застосування [3, 6, 7].

Вважається, що постнатальні стовбурові клітини, виділені з різних тканин, мають значний терапевтичний потенціал для їхнього відновлення [6, 8]. Тому необхідно розробити оптимальну стратегію та підходи до подолання проблем, які сьогодні постали перед дослідниками у ви-



**Мал. 1.** Проліферація СКПЗ (а) та СККМ (б) на стандартному клітинному ФБС-середовищі і на клітинному середовищі з автосироваткою. Здатність СКПЗ і СККМ до створення колоній на стандартному ФБС-середовищі і на клітинному середовищі з автосироваткою (в)

вченні клінічної ефективності різних популяцій стовбурових клітин. У цьому дослідженні ми охарактеризуємо ізолювання мезенхімальних стовбурових клітин із пульпи зуба і кісткового мозку миші, а також метод розмноження клітин при використанні автосироватки.

## Матеріали та методи дослідження

### Виділення та культивування первинних стовбурових клітин

Стовбурові клітини пульпи зуба (СКПЗ) були виділені одномоментним комплексним способом (5 чотиритижневих

мишей лінії C57BL/6N на препарування). Корінні зуби були відділені від нижньої щелепи, м'які тканини пульпи — ізолювані. Тканину промивали фосфатним буфером (ФБС) і обробляли колагеназою типу IV з розрахунку 2 мг/мл упродовж 60 хв. при 37°C. Відтак однакову кількість фосфатного буфера додали до первинного деривату, фільтрували через 70 мм нейлонові фільтри, потім центрифугували зі швидкістю 300 г упродовж 10 хв. при кімнатній температурі. Далі клітини ресуспендували у клітинний медіум стовбурових клітин і висівали в окремі чашки для клітинних культур [7].

Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (МСКМ) були виділені зі стегна та гомілки мишей (5 мишей лінії C57BL/6N на препарування). М'язи та інші тканини — видалені. Кістковий мозок отримано шляхом промивання кісток. Кістково-мозкові мононуклеарні клітини були виділені з використанням градієнту фікол і культивовані в медіумі стовбурових клітин [5, 8].

Перед виділенням СКПЗ і МКМ від кожної тварини забрано кров і заготовлено сироватку. Ізолювані СКПЗ і МКМ культивували як і в DMEM з 5% ФБС середовищі, так і у середовищі, яке містило мишачу автосироватку, в інку-

баторі при 37°C з 5% вмістом вуглекислого газу.

### Аналіз проліферації *in vitro*

Ріст клітин визначали з використанням 3(4,5-метил тіазол-2-ил) – 2,5-дифенілтетразолійного (МТТ) колориметричного аналізу проліферації. По 2000 клітин на лунку висівали в 96-лункові чашки і культивували протягом 4 днів. Ріст клітин визначали, додаючи розчин МТТ (50 мкг/лунку) протягом 4 годин. Клітинний МТТ розчиняли кислотою ізопропанолу та вимірювали оптичну щільність при 570 нм. Усі експерименти проводилися тричі у трьох серіях [9, 10].

### Аналіз формування колоній

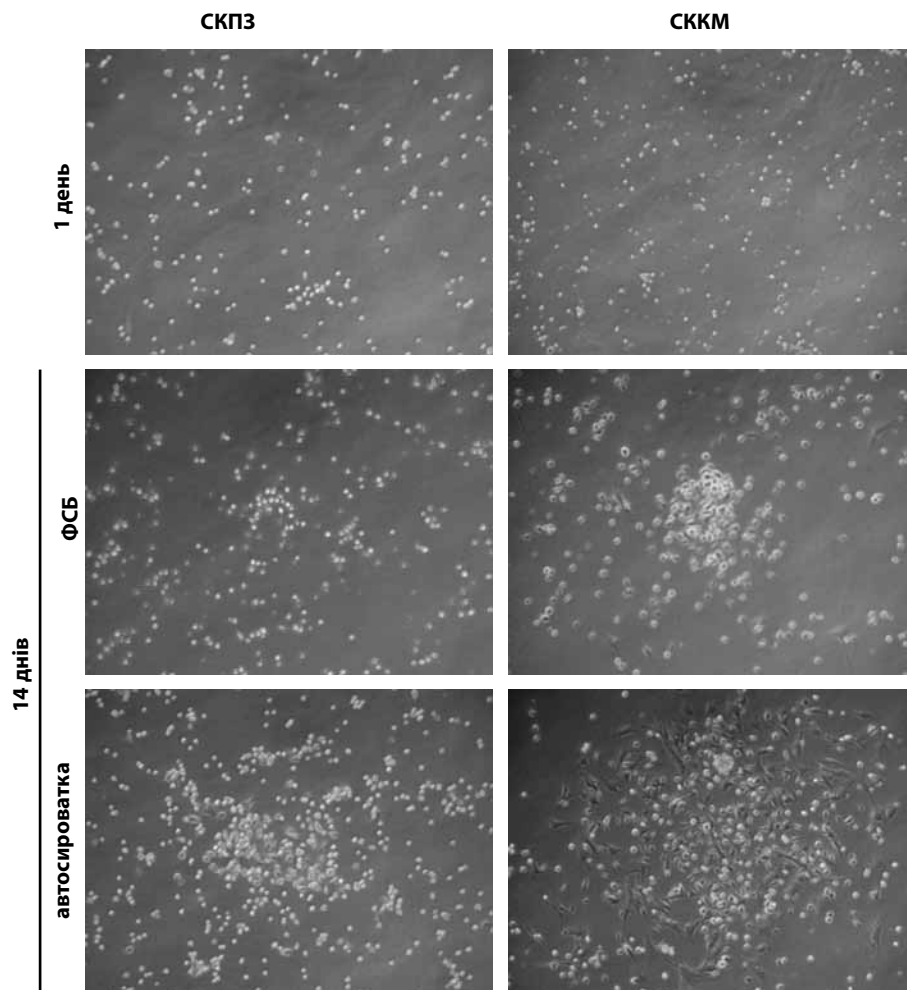
Щоб перевірити здатність до колонієутворення, клітини репліціювали при щільності 100 клітин на 94-мм чашку в три чашки. Через 14 днів колонії візуалізували і підраховували після фіксації в 4% формальдегіді з подальшим забарвленням 0,5% кристалічним метиленовим синім упродовж 5 хвилин. Клітини двічі промивали в дистильованій воді і визначали кількість колоній на чашку (агрегати  $\geq 50$  клітин вважали колоніями) [1].

### Статистичний аналіз

Результати представлені як середні  $\pm$  стандартна похибка середнього (SEM), якщо інше не вказано. Значення вірогідне при  $p < 0,05$ . Статистичний аналіз проводили з використанням GraphPad Prism™5 (програмне забезпечення GraphPad) [11].

### Результати дослідження та їх обговорення

Для того, щоб порівняти ріст СКПЗ і СККМ у ФБС та в автосироватці, використали метод аналізу проліферації *in vitro*. Цей експеримент показав зростання проліферації як і СКПЗ, так і СККМ, культивованих у клітинному середовищі з автосироваткою, порівняно зі стандартним клітинним середовищем на основі ФБС. Проліферація СКПЗ на стандартному клітинному



**Мал. 2.** Ріст СКПЗ і СККМ після двотижневого інкубаційного періоду на стандартному клітинному ФБС-середовищі і на клітинному середовищі з автосироваткою. Фазово-контрастна мікроскопія живих клітин

ФБС-середовищі після двох днів становила 120%, а через чотири дні – 140%, водночас проліферація СКПЗ, культивованих на клітинному середовищі з автосироваткою становила 130% після двох днів і 160% після чотирьох днів (мал. 1а). Стосовно СККМ у стандартному клітинному ФБС-середовищі, то їхня проліферація після двох днів становила 115%, а через чотири дні – 145%. СККМ у клітинному середовищі з автосироватки через два дні поліферація становила 135%, а після чотирьох днів – 160% (мал. 1б). Ці результати доводять, що культивування із застосуванням автосироватки забезпечує кращі умови для проліферації первинних стовбурових клітин.

Однією із характеристик мезенхімальних стовбурових клітин є колонієутворення [12]. Ми проаналізували роль

автосироватки в утворенні колоній для СКПЗ і СККМ. Після 14 днів культивування в ФБС-середовищі СКПЗ створили  $19,3 \pm 2,3$  колоній, тоді як СКПЗ, культивовані в середовищі з автосироваткою, створили  $32,0 \pm 4,6$  колоній за той самий період ( $p < 0,05$ ) (мал. 1в). Аналогічно утворення колоній СККМ після двох тижнів культивування було більшим у середовищі з автосироваткою ( $44,3 \pm 4,2$ ), порівняно з ФБС-середовищем ( $35,7 \pm 2,8$ ) ( $P < 0,05$ ) (мал. 1в). Відповідно до попередніх результатів, цей експеримент показав перевагу автосироватки для проліферації стовбурових клітин.

Фазово-контрастна мікроскопія культивованих стовбурових клітин також виявила значне збільшення кількості клітин при культивуванні в автосироватці, порівняно з ФБС-клітинним середовищем (мал. 2).

## Висновки

Отримані результати показують, що сироватка аутологічного походження створює кращі умови для живлення клітин, аніж нутрієнти-деривати від ксеновидів. Можна припустити, що на-

явність певних специфічних факторів росту відіграє ключову роль у процесі культивування клітин, однак це досі не виявлено. Недоліком методу є недостатня кількість отриманої аутосироватки. На відміну від великих тварин, у гризунів, а особливо у мишей, немож-

ливо забрати більшу кількість крові. Однак використання аутосироватки для свіжоізолюваних стовбурових клітин сприяє стимуляції клітин у процесі культивування та може успішно використовуватися, принаймні на початковому етапі культивування.

## Список використаної літератури

1. Asari T., et al. Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2012. — 417(4). — P. 1193–1199.
2. Modder U.I., et al. Characterization of mesenchymal progenitor cells isolated from human bone marrow by negative selection // *Bone.* — 2012. — 50(3). — P. 804–810.
3. Kerkis I., et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers // *Cells Tissues Organs.* — 2006. — 184(3–4). — P. 105–116.
4. Gong M., et al. Immortalized mesenchymal stem cells: an alternative to primary mesenchymal stem cells in neuronal differentiation and neuroregeneration associated studies. — *J Biomed Sci.* — 2011. — 18. — P. 87.
5. Asumda F.Z., Chase P.B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. — *BMC Cell Biol.* — 2011. — 12. — P. 44.
6. Nakashima M., Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. — *Adv. Dent Res.* — 2011. — 23(3). — P. 313–319.
7. Janebodin K. et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. — *PLoS One.* — 2011. — 6(11). — P. 27.
8. Lee E.S. et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the developing mouse eye. — *Acta Histochem Cytochem.* — 2011. — 44(5). — P. 213–221.
9. Abiatari I. et al. Moesin-dependent cytoskeleton remodeling is associated with an anaplastic phenotype of pancreatic cancer. — *J Cell Mol Med.* — 2010. — 14(5). — P. 1166–1179.
10. Zhang, W. et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) in pancreatic neoplasm and pancreatic stellate cells. — *Cancer Biol Ther.* — 2007. — 6(2). — P. 218–227.
11. Abiatari I. et al. Hsulf-1 regulates growth and invasion of pancreatic cancer cells. — *J Clin Pathol.* — 2006. — 59(10). — P. 1052–1058.
12. Veronesi F., et al. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. — *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* — 2011. — 21(4). — P. 363–377.