

ДО МЕТОДИКИ ОТРИМАННЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПОНІ

А. Й. Мазуркевич¹, М. О. Малюк¹, Ю. О. Харкевич¹, Є. П. Бруско²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України

²Кінно-спортивний клуб «Магнат»

Апробовано метод відбору кісткового мозку від великих тварин (на прикладі поні) у ділянці зовнішнього горба клубової кістки (маклока). Встановлено, що даний спосіб відбору є виправданим, оскільки маклок розташований близько до шкіри, через що прикритий лише тонким шаром м'яких тканин. Це дозволяє мінімізувати оперативно-травматичне пошкодження тканин, яке обов'язково супроводжує відбір кісткового мозку незалежно від кістки, з якої його відбирають, а отже і знизити ризик травматизації тварини. Аналіз результатів колонієформуючої здатності та проліферативного потенціалу стовбурових клітин кісткового мозку поні на 0 пасажі показав, що склад культурального середовища має суттєвий вплив на швидкість прояву колонієформуючої здатності клітин та їх проліферативну активність. Встановлено, що сироватка крові коня непридатна для культивування стовбурових клітин кісткового мозку поні, оскільки знижує адгезивні властивості клітин при пасажуванні.

Сучасний стан розвитку медико-біологічних наук характеризується пошуком нових методів і засобів лікування тварин з різноманітними патологічними процесами, які були б достатньо ефективними, відносно недорогими, і головне, максимально сумісними з біологічними властивостями живого організму. Перевагу надають способам і засобам, здатним не лише брати безпосередню участь у відновленні структури та функції ушкодженого органу чи системи, а й активізувати внутрішні ресурси організму, спрямовані на відновлення їх морфо-функціонального стану.

Такими характеристиками володіє досить обмежена кількість лікувальних засобів, серед яких важливими є стовбурові клітини.

Вдосконалення методів отримання та культивування стовбурових клітин людини, їх направлено диференціювання і застосування у гуманній медицині дав поштовх для активізації наукових досліджень щодо їх застосування при лікуванні тварин [1–3].

Незважаючи на недостатню ще поширеність застосовуваних методів використання стовбурових клітин із лікувальною метою у ветеринарній медицині, наукові дослідження у цій сфері переконливо доводять високу ефективність і привертають все більшу увагу дослідників як потенційні кандидати клітинно-заміщувальної терапії при лікуванні тварин [4–6].

Актуальність даних досліджень чітко простежується у ветеринарній травматології, зокрема при патологіях хрящової тканини та зв'язок, які володіють обмеженими потенціями до відновлення, особливо у спортивних коней, цінних порід собак, циркових тварин, високопродуктивних тварин та племінних плідників; у дерматології при репарації шкіри після оперативного втручання на м'язах чи внутрішніх органах, після її ушкодження; при ушкодженні спинного мозку; при захворюваннях серця, печінки, нирок тощо [7–10].

Як відомо, основним джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок. Даних щодо методичних підходів отримання кісткового мозку від щурів, кролів, котів і собак та культивування їхніх стовбурових клітин є в достатку [11–13].

Разом з тим, методичні підходи щодо отримання стовбурових клітин у великих продуктивних тварин (коней, поні, ВРХ) поки-що поодинокі. З огляду на це, метою нашої роботи було визначити найбільш оптимальні оперативні та методичні підходи для отримання кісткового мозку та виділення із отриманого біоптату стовбурових клітин у великих тварин (на прикладі поні) та їх культивування.

Матеріали і методи. Кістковий мозок відбирали від клінічно здорового поні віком 1 рік у ділянці зовнішнього горба клубової кістки (маклока).

З метою знеболення та надійної фіксації тварину вводили у загальний наркоз із послідувочною інфільтрацією м'яких тканин у ділянці проколу кістки 2 %-м розчином лідокаїну.

Премедикацію поводили шляхом внутрішньовенного введення детомідину у дозі 0,02 мг/кг маси тварини. У якості загального анестетика застосовували пропофол у дозі 2 мг/кг маси тварини, який також вводили внутрішньовенно.

Тварину фіксували у лівому лежачому боковому положенні. Місце оперативного доступу попередньо пальпували, визначаючи дорсальну, вентральну, краніальну та каудальну межі маклока.

Кістковий мозок відбирали з допомогою голки для трепанобіопсії кісткової тканини (Sterylab, Італія) (рис. 1).



Рис. 1. Відбір кісткового мозку від поні

Місце проколу шкіри в ділянці оперативного втручання попередньо дезінфікували 5 %-м спиртовим розчином йоду. Голку для відбору кісткового мозку ставили перпендикулярно до шкіри, проколювали її та, повертаючи за годинниковою стрілкою, поступово просували у напрямку до кістки. При досягненні маклока зусилля збільшували, просуваючи голку на глибину 4–5 см, після чого її повертання зупиняли та виймали стилет. До зовнішнього отвору голки приєднували шприц, об'ємом 20 см³ та аспірували кістковий мозок. У шприц попередньо набирали гепарин із розрахунку 20 ОД на 1 см³ об'єму. Після аспірації кісткового мозку шприц від'єднували, а голку, повертаючи проти годинникової стрілки, виймали. До місця проколу шкіри, з метою зупинки кровотечі, на кілька хвилин прикладали стерильний ватно-марлевий тампон, після чого місце проколу знову обробляли 5 %-м спиртовим розчином йоду.

З метою отримання фракції мононуклеарних клітин аспірат кісткового мозку у 2 рази розводили фосфатно-буферним розчином, після чого центрифугували протягом 30 хвилин у градієнті щільності Histopaque ($\rho=1,077$) при відцентровій силі 300 g. Отримані таким чином мононуклеарні клітини у кількості 6 млн вносили у чашки Петрі (d=3 см), додавали культуральне середовище (80 % — DMEM, 20 % — ембріональна сироватка теляти) та ставили у СО₂-інкубатор для культивування при t 37 °С та 5 %-му вмісті СО₂.

З метою дослідження можливості часткової заміни ембріональної сироватки теляти на сироватку від дорослих тварин, а також впливу цієї сироватки на колонієформуючу здатність

та проліферативний потенціал стовбурових клітин на 0 пасажі, у склад культурального середовища у дослідних чашках Петрі ввели 5 % (від загального об'єму середовища) сироватку крові коня, залишивши незмінним вміст DMEM та зменшивши вміст ембріональної сироватки теляти до 15 %. Отже, нами було сформовано дві групи культивуємих клітин: контрольну (80 % — DMEM, 20 % — ембріональна сироватка теляти) та дослідну (80 % — DMEM, 15 % — ембріональна сироватка теляти, 5 % — сироватка крові коня).

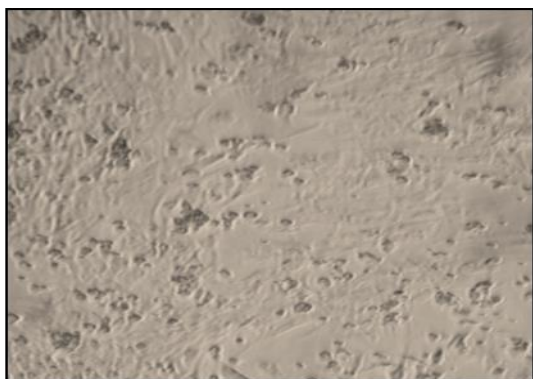
Результати й обговорення. Апробований підхід у відборі кісткового мозку від великих тварин на прикладі поні у ділянці зовнішнього горба клубової кістки виявився виправданим, оскільки малок розташований близько до шкіри, через що прикритий лише тонким шаром м'яких тканин. Це дозволяє мінімізувати оперативно-травматичне пошкодження тканин, яке обов'язково супроводжує відбір кісткового мозку, незалежно від кістки, з якої його відбирають, а отже і знизити ризик травматизації тварини. Разом з тим, з-поміж інших кісток, клубова кістка у ділянці зовнішнього горба містить найбільшу кількість губчастої кісткової тканини, що передбачає наявність і більшої кількості в ній стовбурових клітин.

Аналіз результатів колонієформуємих здатності та проліферативного потенціалу стовбурових клітин кісткового мозку поні на 0 пасажі показав, що склад культурального середовища має суттєвий вплив на швидкість прояву колонієформуємих здатності клітин та їх проліферативну активність.

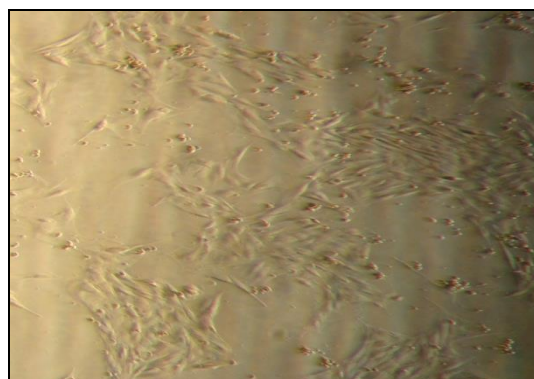
Так, у досліді із частковою заміною ембріональної сироватки теляти на сироватку крові коня (дослідна група) перші колонії клітин починали з'являтися/формуємися уже на 6-ту добу культивуємих, тоді як у контрольних чашках Петрі — лише на 7-му добу.

Варто зазначити, що колонії у чашках Петрі із сироваткою крові коня були набагато численнішими та рівномірно розміщувалися по усій площі дна чашок, порівняно з чашками Петрі без цієї сироватки. При цьому спостерігалась клональність культивуємих клітин дослідної групи — клітини різних колоній були різної форми (овальні, кубічні, фібробластоподібні) та розміру. Культивовані клітини контрольної групи мали гомогенну фібробластоподібну морфологію, характерну для мезенхімальних стовбурових клітин.

На 11 добу культивуємих колонії клітин у чашках Петрі, у які додавали сироватку крові коня, досягали значних розмірів, що частково призводило до їх злиття та утворення суцільного моношару, чого не спостерігалось у чашках Петрі зі стандартним культуральним середовищем без додавання сироватки крові коня (рис. 2-а, 2-б).



а



б

Рис. 2. Стовбурові клітини кісткового мозку поні (0 пасажі): а – клітини контрольної групи; б – клітини дослідної групи, x 100

На 14 добу культивуємих у чашках Петрі, у які додавали сироватку крові коня, експансія клітин становила близько 90 %, тоді як у чашках зі стандартним культуральним середовищем — близько 70 %. Підрахунок клітин під час першого пасажування виявив

достовірно більшу їх кількість у чашках Петрі із частковою заміною ембріональної сироватки теляти на сироватку крові коня (табл.).

Таблиця

Вплив складу культурального середовища на проліферативну активність стовбурових клітин кісткового мозку (M±m, n=3)

Культивуючі клітини	Склад культурального середовища	Кількість клітин, тис
Контрольної групи	80 % – DMEM, 20 % – ембріональна сироватка теляти	416283±22254
Дослідної групи	80 % – DMEM, 15% – ембріональна сироватка теляти, 5 % – сироватка крові коня	544300±21141*

Примітка: * — P<0,05

Разом з тим, варто зазначити, що аналіз стану прикріплення культивованих клітин до дна культуральних чашок, їх розпластування та здатності до проліферації після першого пасажування виявив те, що більшість клітин, які культивувалися у присутності сироватки крові коня, втрачали здатність до адгезії (95 % пасажованих клітин перебували у товщі культурального середовища), а отже — і проліферації. Клітини, які культивувалися у стандартному культуральному середовищі пасажування перенесли легко: майже 75 % клітин адгезувало до культуральних чашок, розпласталось та проліферувало.

Отже, культивування стовбурових клітин поні на 0 пасажі в присутності сироватки крові коня, на нашу думку, призводить до активної адгезії прогеніторних клітин кісткового мозку, які активно проліферують перед цитодиференціюванням, але не здатні до самовідновлення, або ж сироватка крові коня містить специфічні фактори, які, очевидно, спонукають мультипотентні стовбурові клітини до ціленаправленого цитодиференціювання.

ВИСНОВКИ

1. Апробований метод відбору кісткового мозку у великих тварин (на прикладі поні) у ділянці маклока є простим у виконанні та практично нетравматичним для навколишніх тканин.

2. Сироватка крові коня, при додаванні її до культурального середовища, знижує адгезивні властивості клітин при пасажуванні, тому є непридатною для культивування стовбурових клітин кісткового мозку поні.

Перспективи подальших досліджень. Відпрацювання методик відбору кісткового мозку від великих тварин та культивування їх стовбурових клітин має велике значення в подальших дослідженнях щодо можливості застосування цих клітин у клініці, зокрема, під час ушкодження опорно-рухового апарату тварин у кінно-спортивній сфері.

TO METHODS OF OBTAINING OF BONE MARROW AND CULTIVATION OF STEM CELLS OF PONY

A. Mazurkevych¹, N. Maliuk¹, I. Kharkevych¹, E. Brusco²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

²Equestrian club «Magnate»

S U M M A R Y

Proven the method of obtaining of bone marrow from large animals (a pony) in the region of the external hill of iliac bone. Found that this method of obtaining of bone marrow is justified

because external hill of iliac bone is located close to the skin and covered by a thin layer of soft tissues. This lets to minimize a tissue damage, which always accompanies the obtaining of bone marrow in dependently of bone from which it is obtained, and reduce the risk of traumatization of animal. Analysis of kolony forming ability and proliferative potential of bone marrow stem cells pony at 0 passage showed that the composition of the culture medium has a significant impact on the speed of displaying of kolony forming ability of cells and their proliferative activity. Found that horse serum is not suitable for the cultivation of bone marrow stem cells of pony because it reduces the adhesive properties of cells after passaging.

К МЕТОДИКЕ ПОЛУЧЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОНИ

А. И. Мазуркевич¹, Н. А. Малюк¹, Ю. А. Харкевич¹, Е. П. Бруско²

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

²Конно-спортивный клуб «Магнат»

А Н Н О Т А Ц И Я

Апробирован метод отбора костного мозга от крупных животных (на примере пони) в области внешнего бугра подвздошной кости (маклока). Установлено, что данный метод отбора есть оправданным, поскольку маклок расположен близко к коже, через что прикрыт лишь тонким слоем мягких тканей. Это позволяет минимизировать оперативно-травматическое повреждение тканей, которое обязательно сопровождает отбор костного мозга независимо от кости, из которой его отбирают, а значит и снизить риск травматизации животного. Анализ результатов колониеобразующей способности и пролиферативного потенциала стволовых клеток костного мозга пони на 0 пассаже показал, что состав культуральной среды оказывает существенное влияние на скорость проявления колониеобразующей способности клеток и их пролиферативную активность. Установлено, что сыворотка крови лошади непригодна для культивирования стволовых клеток костного мозга пони, поскольку снижает адгезивные свойства клеток при пассажировании.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Владимирская Е. Б.* Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Е. Б. Владимирская, О. А. Майорова, С. А. Румянцев, А. Г. Румянцев. — М.: Медпрактика. — 2005. — 392 с.

2. *Кухарчук О. Л.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / О. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман. — Черновцы.: Золоті литаври. — 2004. — 505 с.

3. *Мазуркевич А.Й.* Вплив мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та ембріональних фібробластів щурів на перебіг репаративних процесів у їхній шкірі / А. Й. Мазуркевич, Ю. О. Харкевич, М. О. Малюк та ін. // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. — 2010. — Вип. 151, Ч.1. — С. 197–205.

4. *Мазуркевич А. Й.* Біохімічні показники крові та сечі після застосування мезенхімальних стовбурових клітин при експериментальній нирковій недостатності у щурів / А. Й. Мазуркевич, О. Л. Бобось, М. О. Малюк та ін. // Біологія тварин. — 2012. — Т.14, № 1-2. — С. 397–402.

5. Мазуркевич А. Й. Зміна біохімічних показників сироватки крові щурів при експериментальному хронічному токсичному гепатиті / А. Й. Мазуркевич, Н. І. Золтан, М. О. Малюк та ін. // Біологія тварин. — 2012. — Т. 14, № 1–2. — С. 334–340.
6. Kon E. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones / E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi et al. // J. Biomed Mater. Res. — 2000. — Vol.49. — P. 328–337.
7. Smith R. K. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment/ R. K. Smith, M. Korda, G.W. Blunn et al. // Equine Veterinary Journal. — 2003. — Vol. 35. — P. 99–102.
8. Sasaki M. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Trans differentiation into Multiple Skin Cell Type/ M. Sasaki, R. Abe, Y. Fujita et al. // The Journal of Immunology. — 2008. — Vol. 180. — P. 2581–2587.
9. Jang B. J. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs/ B. J. Jang, Y. E. Byeon, J. H. Lim et al. // J. Vet. Sci. — 2008. — Vol. 9, № 4.—P. 387–393.
10. Lim J.H. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs / J. H. Lim, Y. E. Byeon, H. H. Ryu // J. Vet. Sci. — 2007. — Vol. 8, № 3.— P. 275–282.
11. Патент України на корисну модель № 46600, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Сушко М. І.—№и 2009 07829. Заявл. 24.07.2009. Опубл. 25.12.2009. Бюл. № 24.
12. Патент України на корисну модель № 47783, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку котів із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О. — № и 2009 08607. Заявл. 14.08.2009. Опубл. 25.02.2010. Бюл. № 4.
13. Патент України на корисну модель № 50905, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю / Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Сушко М. І. — № и 2009 13880. Заявл. 29.12.2009. Опубл. 25.06.2010. Бюл. № 12.