

Біологічна активність стовбурових клітин із кісткового мозку коня

Анотація. Експериментально досліджено вдосконалений спосіб виділення фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку коней шляхом центрифугування суспензії цих клітин у фікол-верографіновому градієнті щільності. Встановлено, що оптимальними умовами для одержання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку коней, збагаченої популяцією мультипотентних стовбурових клітин, є центрифугування аспірату кісткового мозку у градієнті щільності $\rho=1,076$ при відцентровій силі 300 g.

Ключові слова: мультипотентні стовбурові клітини, гемопоетичні стовбурові клітини, мононуклеарні клітини, кістковий мозок, градієнт щільності.

Biological activity of multipotent stem cells of horses depending on the way of obtaining of mononuclear cells from bone marrow aspirate. ANATOLIY Y. Mazurkevych, MYKOLA O. Malyuk, VITALIY V. Kovpak, YURIY O. Kharkevych (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).

Abstract. Experimental studies which are relating to improving the process of obtaining of the fraction of mononuclear cells from bone marrow of horses by centrifugation of cell suspension in fikol density gradient were conducted. It was established that the optimal conditions for obtaining the fraction of mononuclear bone marrow cells which are enriched with multipotent stem cells of horses is centrifugation of bone marrow aspirate in a density gradient $\rho = 1,076$ with centrifugal force of 300 g.

Key words: multipotent stem cells, hematopoietic stem cells, mononuclear cells, bone marrow, density gradient.

А. МАЗУРКЕВИЧ, докт.вет.наук
М. МАЛЮК, В. КОВПАК, Ю. ХАРКЕВИЧ,
кандидати вет.наук

Національний університет біоресурсів і
природокористування України

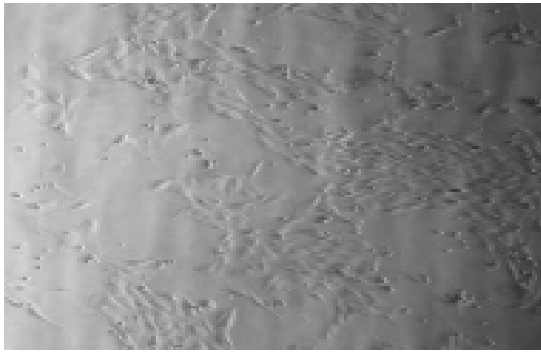
Вилучення з кісткового мозку тварин фракції мононуклеарних клітин – важлива передумова забезпечення високої біологічної активності для стовбурових клітин, призначених для використання їх у клітиннозаміщувальній терапії, оскільки саме кістковий мозок основне їх джерело, а дана фракція клітин містить їх у достатній для напрацювання кількості [6].

Оскільки в пробах, відібраних із кісткового мозку, мононуклеарні клітини (фібробласти, макрофаги, адипоцити, остеобласти, остеокласти, ендотеліальні клітини, мультипотентні (МСК) та гемопоетичні стовбурові клітини тощо) складають незначну кількість від загального числа його клітин, ведеться пошук таких методів виділення мононуклеарних клітин, які б характеризувалися високим вмістом МСК та/або швидким нарощуванням їх біомаси [1].

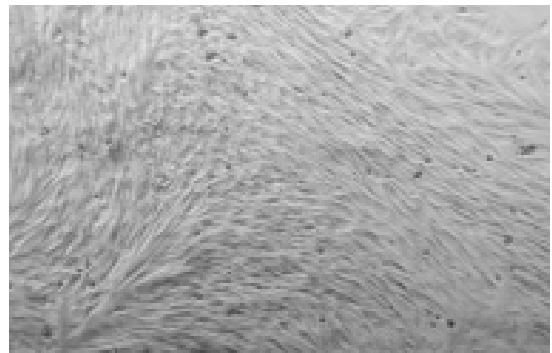
У нинішніх умовах найбільш широко викорис-



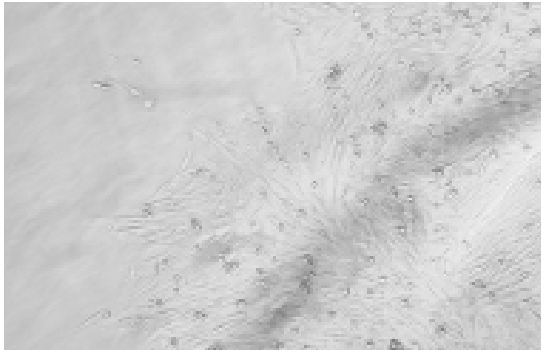
товуваним методом виділення МСК з кісткового мозку тварин залишається висаджування нативної суспензії клітин у культуральні чашки чи матраци та подальша селекція в культурі за здатністю адгезуватися до пластику. Однак, даний підхід виділення МСК потребує на перших порах часті зміни культурального середовища з метою видалення продуктів руйнування еритроцитів, що, у свою чергу, призводить до істотного збільшення тривалості цього процесу та додаткових матеріальних витрат.



а



б

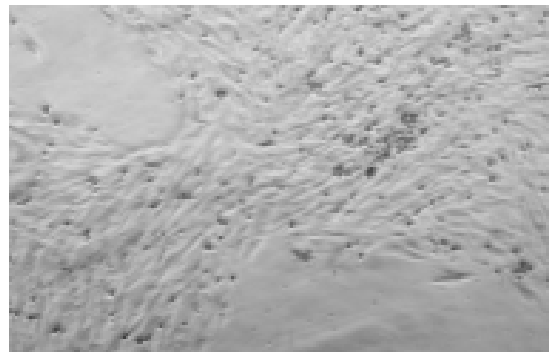


в



г

Стовбурові клітини коня після центрифугування суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності на нульовому пасажі: $\rho = 1,074$ (а), $\rho = 1,076$ (б), $\rho = 1,078$ (в), $\rho = 1,080$ (г) і $\rho = 1,082$ (д) (11-й день культивування), $\times 100$.



д

Останнім часом у ветеринарній медицині апробований метод одержання МСК з кісткового мозку тварин, який ґрунтується на урахуванні різної щільності клітин, що містяться у ньому, та здатності їх розділятися у градієнті щільності [3, 4, 5]. Даний метод запозичений з гуманної медицини, де його використовують для виділення лімфоцитів з периферичної крові людей [7]. За цим методом одержану суспензію клітин кісткового мозку розбавляють фосфатно-буферним розчином та центрифугують, використовуючи відповідну відцентрову силу та градієнт щільності фікол-верографіну. Мононуклеарні клітини, які на відміну від еритроцитів та гранулоцитів мають високу щільність, не здатні пройти крізь шар градієнту, який має більшу щільність, ніж самі клітини, і тому залишаються на його поверхні. Даний метод виділення фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку успішно апробований у досліджах на кролях, котах та собаках. Водночас подібної методики виділення фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку у коней у доступних джерелах нами не виявлено.

З огляду на це, метою нашої роботи була апробація та вдосконалення способу одержання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку коней, збагаченої популяцією мезенхімальних стовбурових клітин, з допомогою центрифугування аспірату кісткового мозку у фікол-верографіновому градієнті щільності.

Кістковий мозок відбирали від клінічно здорових коней віком 1–2 роки у ділянці зовнішнього горба клубової кістки. З метою знеболення та надійної фіксації тварин операцію проводили під загальним наркозом з подальшою інфільтрацією м'яких тканин у ділянці проколу кістки 2%-им розчином лідокаїну. Проводили премедикацію 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 [1].

Проліферативна активність МСК коня залежно від величини градієнту щільності при відцентровій силі 300 g (n=3, M±m)

Градієнт щільності, ρ	Кількість клітин / чашку Петрі
1,074 (контроль)	160540+/-43233
1,076	372185+/-22584*
1,078	214423+/-20648
1,080	63883+/-52912
1,082	247198+/-104211

Примітка. * - P<0,05

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

Кістковий мозок відбирали з допомогою голки для трепанобіопсії кісткової тканини та 20-міліметрового шприца. Вилучену суспензію клітин, розбавлену фосфатно-буферним розчином у співвідношенні 1:5 (8 см³), нашаровували на попередньо внесений у стерильні пробірки фікол-верографіновий градієнт щільності (= 1,074; = 1,076; = 1,078; = 1,080; 1,082) об'ємом 4 см³ та центрифугували при 300g протягом 25 хв. Після центрифугування спочатку знімали верхній шар надосадової рідини, не порушуючи цілісності розташованого нижче шару мононуклеарних клітин. Після цього обережно переносили шар мононуклеарних клітин у нову стерильну центрифужну пробірку, додавши до нього 10 см³ фосфатно-буферного розчину. Клітини розпіпетовували та знову центрифугували при 300 g протягом 5 хв. Відмивання клітин повторювали двічі.

Осад клітин розпіпетовували у відповідній кількості поживного середовища та вносили в чашки Петрі (S = 9,6 см²) у кількості 3 млн. мононуклеарів. Культивування клітин здійснювали у поживному середовищі Дюльбеко модифікованого Ігла (DMEM) 80 % та ембріональної телячої сироватки (ETC) 20 % з додаванням антибіотика -антимікотика з розрахунку 10 мкл/см³ середовища.

Через 11 діб культивування проводили оцінку результату дослідження за проліферативною активністю отриманих фракцій клітин.

За контроль використано метод отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку шляхом розділення суспензії клітин у градієнті щільності = 1,074.

Результати досліджень. Відомо, що регулювання свого розвитку, росту та ділення клітини, які населяють кістковий мозок, потребують обміну інформацією між собою, яка здійснюється завдяки виробленню (синтезу) резидентними клітинами відповідних факторів росту. При цьому одні клітини активно проліферують (наприклад, мієлобласти чи лімфобласти), інші (мультипотентні стовбурові клітини) – перебувають у так званому дормантному (неактивному) стані та активізуються при наявності в організмі певних патологічних процесів, коли виникає потреба у заміщенні ушкоджених тканин.

Порушення генетично закладеної комбінації клітин кісткового мозку, що спостерігається *ex vivo* після їх розділення у градієнті щільності, порушує генетично встановлену схему міжклітинної взаємодії і спричиняє зміну поведінки клітин *in vitro* при їх культивуванні, яка істотно залежить від комбінації клітин, що було відмічено нами при центрифугуванні в градієнтах щільності різної величини.

Результати досліджень наведені у таблиці і на рисунку. Вони свідчать про те, що параметри центрифугування суспензії клітин кісткового мозку впливають на прояв проліферативного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro*, що, очевидно, пов'язано з різним популяційним складом одержаної фракції мононуклеарних клітин.

Так, центрифугування суспензії клітин кісткового мозку коней у градієнті щільності = 1,076 найоптимальніше для виділення популяції клітин з найвищою проліферативною активністю. При культивуванні фракції мононуклеарних клітин, одержаної за названими параметрами центрифугування, на 11 добу культивування кількість клітин, наділених адгезивними властивостями, становила 372185+/-22584 / чашку Петрі, що вірогідно більше порівняно з центрифугуванням суспензії клітин кісткового мозку коня у градієнті щільності = 1,074, а також у інших градієнтах щільності. Експансія МСК становила близько 90 %, тоді як клітини контрольних зразків, одержані при центрифугуванні суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності 1,074, покривали поверхню культурального посуду лише на 45 %.

У досліді при виділенні фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку з використанням градієнту щільності ρ = 1,078 експансія клітин становила близько 60 %, а ρ = 1,082 – 65 % (табл., рис.).

Найнижчу проліферативну активність мала фракція мононуклеарних клітин, одержана при розділенні суспензії клітин кісткового мозку коня у градієнті щільності ρ = 1,080. Експансія клітин становила менше 20 %.

Висновки

1. Центрифугування суспензії клітин кісткового мозку коней у фікол-верографіновому градієнті щільності – ефективний метод одержання фракції мононуклеарних клітин із аспірату кісткового мозку.

2. Оптимальними умовами для виділення фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку коней, збагаченої популяцією мезенхімальних стовбурових клітин, є центрифугування суспензії клітин кісткового мозку у градієнті щільності $\rho=1,076$ при відцентровій силі 300 g.

ЛІТЕРАТУРА

1. Астахова В.С. *Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека.* – К.: Феникс. – 2000. – 176с.
2. Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Харкевич Ю.О., Бруско Є.П. *До методики отримання кісткового мозку та культивування стовбурових клітин поні // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок.* – 2013. – Вип. 14. – №3-4. – С. 308–313.
3. Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О., Сушко М.І. *Патент України на корисну модель №46600, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю.* №и 2009 07829. Заявл. 24.07.2009. Опубл. 25.12.2009. Бюл. №24.
4. Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Данілов В.Б., Харкевич Ю.О. *Патент України на корисну модель №47783, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку котів із високою проліферативною активністю.* №и 2009 08607. Заявл. 14.08.2009. Опубл. 25.02.2010. Бюл. №4.
5. Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ковпак В.В., Харкевич Ю.О., Сушко М.І. *Патент України на корисну модель №50905, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю.* №и 2009 13880. Заявл. 29.12.2009. Опубл. 25.06.2010. Бюл. №12.
6. Adams M.K. *Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMDMSCs) from the ilium and sternum: Are there differences // Equine Veterinary Journal.* – 2013. – Vol. 45 (3). – P. 372–375.
7. Boyum A. *Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes // Tissue antigens.* – 1974. – №4. – P. 269–274.

К. КОЛЕСНИКОВА, аспірант

Н. ПИЧУК, канд.вет.наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

Поживним у мікробіології називають середовище, що містить різні сполуки складного або простого складу, які використовують для розмноження бактерій та інших мікроорганізмів у лабораторних або промислових умовах. Загальною тенденцією при виготовленні середовищ є використання економічно-рентабельної сировини [1].

Для культивування в промислових умовах використовують велику кількість поживних середовищ, які повинні бути стерильними, мати оптимальну концентрацію водневих іонів (рН), містити необхідні речовини (джерела азоту, вуглецю, ростові та мінеральні елементи) [2,3]. Такі властивості забезпечуються підбором оптимального якісного і кількісного складу, а також технологією виготовлення середовищ.

Білкова поживна основа - універсальний компонент. Саме вона забезпечує біологічну повноцінність та оптимальність розвитку культивованих у ній мікроорганізмів, переважно це гідролізати, які традиційно виготовляють з продуктів тваринного та рослинного походження. Практика показує, що більшість підприємств біологічної промисловості, які використовують середовища з м'ясної сировини, часто переживають дефіцит культивованої бактерійної маси, необхідної для виробництва препаратів.

У системі показників, що характеризують ефективність виробництва і реалізації, одне з провідних місць належить собівартості продукції, у якій як синтетичному показнику відбиваються всі сторони виробничої і фінансово-господарської діяльності організації: ступінь використання матеріальних, трудових і фінансових ресурсів, якість роботи окремих працівників і керівництва в цілому [4].

Собівартість являє собою вартісну оцінку використаних у процесі виробництва природних ресурсів, сировини, матеріалів, палива, енергії, основних засобів, трудових ресурсів, а також інших витрат на виробництво і збут товарів [5].

Головна мета аналізу собівартості - виявлення можливостей більш раціонального використання виробничих ресурсів, зниження витрат на виробництво та реалізацію й забезпечення прибутку.

Поряд з визначенням собівартості, завжди постає такий відносний показник економічної ефективності нового впровадження як рента-