

МЕТОДИКИ

УДК 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083

Буше В.В.

СЕЛЕКТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ IN VITRO

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии НАМНУ Украины» (г. Донецк)

Данная работа является фрагментом научной темы «Исследовать некоторые механизмы остеорепаративных процессов при замедленной консолидации переломов и дефектах костей конечностей при использовании клеточно-тканевых технологий» (№ гос. регистрации 0107U000282).

Вступление. В условиях тяжелого повреждения костной ткани, влекущего формирование значительного дефекта, собственных клеток с остеогенными потенциями сохраняется недостаточно [1]. Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что перспективы улучшения лечения результатов патологии костей только за счёт совершенствования соединения и удержания отломков в основном исчерпаны [2]. Биотехнологические подходы к решению этой проблемы диктуют необходимость разработки и совершенствования методик культивирования остеогенных клеток in vitro с последующей трансплантацией их в зону дефекта [3, 4].

Исходя из насущных запросов клиницистов, а так же потребности инновационных принципов для решения фундаментально-теоретических задач теории костной регенерации, назрела необходимость разработка упрощенного способа получения клеточных линий костной ткани in vitro.

Цель настоящего исследования – разработка методики селективного получения остеогенных клеточных элементов периоста и эндоста in vitro.

Объект и методы исследования. Объектом исследования явились клеточные культуры остеогеннодетерминированных клеток периоста и эндоста.

Для получения клеточных линий костной ткани были проведены экспериментальные исследования на белых беспородных крысах в соответствии с требованием биоэтики. У животных под эфирным наркозом в асептических условиях в области средней трети голени скальпелем осуществляли разрез кожи и выделение берцовой кости. Клеточные линии периоста и эндоста были получены методом эксплантов. В процессе культивирования оценивали морфологию клеток при помощи метода фазово-контрастной микроскопии. Принадлежность полученной культуры клеток к клеткам костной ткани определяли при помощи цитохимической реакции с использова-

нием субстрата BCIP/NBT. Клетки, содержащие щелочную фосфатазу, а также везикулы с ферментом окрашивались в черно-синий цвет различной интенсивности.

Результаты исследований и их обсуждение. Полученные биоптаты помещали в флакон со средой «Игла» («Биолот», Россия) с антибиотиками и выдерживали на протяжении суток, после чего неоднократно промывали ФСБ (фосфатно-солевой буфер).

Для получения клеточных линий надкостницы (n=25) часть костных фрагментов рассекали продольно и тщательно отмывали от костномозгового содержимого физиологическим раствором. Фрагменты помещали на чашки Петри, предварительно обработанные уксуснокислым раствором коллагена I типа, таким образом, чтобы с коллагеновой подложкой контактировала только надкостница (периост) (рис. 1а).

Культивирование клеточных линий периоста (n=25) производили на среде DMEM/F12 1:1 с 20 % содержанием эмбриональной сыворотки плодов коровы («Биолот», Россия), 0,75 мг/мл глутамина («Биолот», Россия), 50 мкг/мл L – аскариновой кислоты («Sigma», USA) и 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов («Sigma», USA). Чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор и культивировали при одинаковых условиях: t = 37°C, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Смену среды производили через каждые 3 суток. При визуализации клеточных линий периоста наблюдали клеточный рост только со стороны надкостницы.

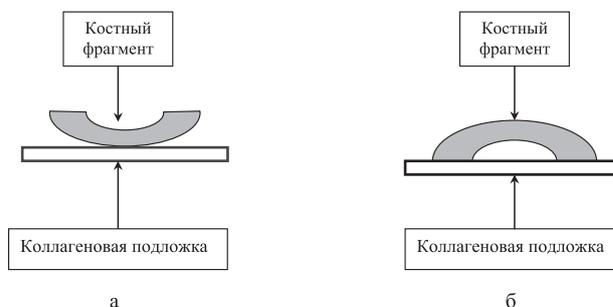


Рис. 1. Положение костных фрагментов на коллагеновой подложке:

а) для культивирования клеток периоста;
б) для культивирования клеток эндоста.

Часть костных фрагментов рассекали продольно, при помощи скальпеля, тщательно очищали скальпелем от надкостницы и отмывали от костномозгового содержимого физиологическим раствором и помещали костные фрагменты на чашки Петри, обработанные коллагеном таким образом, чтобы с коллагеновой подложкой контактировала только костная ткань (рис. 1б). Культивирование клеточных линий эндоста ($n=25$) производили так же как и культур периоста. При микроскопии клеточных культур эндоста наблюдали клеточный рост только со стороны непосредственно костной ткани и костномозгового канала.

На 3-4 день культивирования наблюдалась активная миграция клеток периоста из эксплантов, а к концу первой неделе культивирования – их распластывание. При формировании монослоя (16-18 день культивирования) клетки периоста имели характерную для данного клеточного типа морфологию – веретенообразную форму, плотно прилегали одна к другой и располагались параллельно (рис. 2а). При выявлении продукции культивированными клетками периоста ЩФ наблюдали положительную реакцию (рис. 2б).

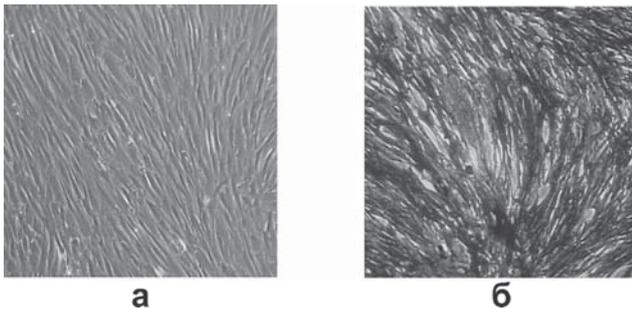


Рис. 2. Клеточная культура клеток периоста:
а – монослой, сформированный пролиферирующими клетками периоста;
б – положительная реакция на ЩФ.

Эндостальные клетки начинали пролиферировать на 7-8-е сутки культивирования. К концу третьей недели они формировали монослой, сформированный клетками, активно продуцирующими ЩФ (3б). В процессе культивирования клетки эндоста имели округлую форму, характерную для остеобластных клеток (рис. 3а).

Выводы. Клетки периоста и эндоста могут быть успешно получены, размножены в культу-

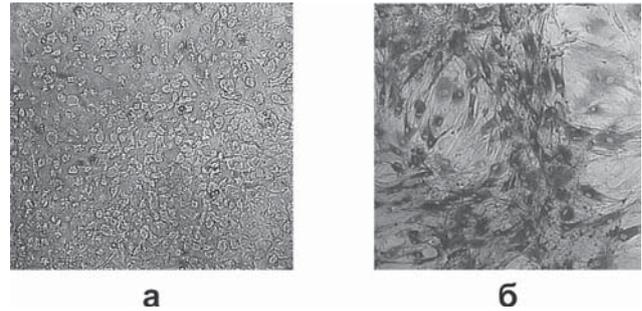


Рис. 3. Клеточная культура клеток эндоста:
а – монослой, сформированный пролиферирующими клетками эндоста;
б – положительная реакция на ЩФ.

ре и использованы для клинического применения, а так же в фундаментальных разработках предложенным способом. Выделение и культивирование остеогенных клеточных линий методом эксплантов легче, клетки не повреждаются как при энзиматическом переваривании, что приводит к повреждению рецепторов и антигенов поверхностей клеточных мембран, а также отсутствует необходимость неоднократной очистки полученной клеточной суспензии (как в случае ферментативной обработки костной ткани), поскольку при создании определенных условий возможна пролиферация лишь требуемого клеточного типа. Однако данный метод требует более значительных временных затрат (2 – 4 недели).

Перспективы дальнейших исследований. Планируется провести исследования по оптимизации условий культивирования с целью сокращения сроков получения конфлюэнтных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга / В.Г. Гололобов, А.К. Дулаев, Р.В. Деев Р.В. [и др.] // Клеточная трансплантология. — 2004. — № 1. — С. 15–16.
2. Трансплантация остеогенных клеток в ортопедии и травматологии (обзор литературы) / В.Н. Казаков, В.Г. Климовицкий, В.К. Гринь. [и др.] // Журн. АМН України. — 2006 – Т. 12, № 2. – С. 229 – 241
3. Hutmacher D.W. Periosteal cells in bone tissue engineering / D.W. Hutmacher, M. Sittertinger // Tissue Eng. – 2003 – Vol. 9, Suppl 1 – P. 45-64.
4. Susan S. Tseng. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing / Tseng Susan S., Lee Mark A., Reddi A. Hari // The Journal of Bone and Joint Surgery (American). – 2008. – 90. – P. 92 – 98

УДК 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083

СЕЛЕКТИВНЕ ОТРИМАННЯ ОСТЕОГЕННИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ IN VITRO

Буше В.В.

Резюме. Розроблена спрощена технологія отримання остеогенних клітин в залежності від розташування кісткових фрагментів на колагеновій підложці. Клітинні лінії периоста та эндоста можуть бути успішно ізольовані, розмножені в культурі та застосовані.

Ключові слова: культивування, клітини периосту, клітини эндосту.

УДК 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083

СЕЛЕКТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ IN VITRO

Буше В.В.

Резюме. Разработана упрощенная технология получения остеогенных клеток в зависимости от расположения костных фрагментов на коллагеновой подложке. Клеточные линии периоста и эндоста могут быть успешно выделены, размножены в культуре и использованы.

Ключевые слова: культивирование, клетки периоста, клетки эндоста.

UDC 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083

The OSTEOGENOUS CELLS LINE SELECTIVE PRODUCTION IN VITRO

Bushe V.V.

Summary. The simplified method of getting osteogenous cells depending on bone fragment location on the collagen substrate was developed. Cell lines of periosteum and endosteum can be isolated, replicated and used successfully.

Key words: cultivation, periosteum cells, endosteum cells.

Стаття надійшла 10.02.2011 р.

УДК 573.6:577.21-076

А.М. Феськов, И.А. Феськова, Е.С. Жилкова, В.В. Грабарь, Е.В. Блажко

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭМБРИОНОВ ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО ХРОМОСОМАМ X, Y, 18

Центр репродукции человека «Клиника профессора Феськова А.М.» (г. Харьков)

Вступление. Проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД) анеуплоидий эмбрионов методом FISH в ходе выполнения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) позволяет повысить шансы рождения здорового ЭКО-ребенка. Показаниями для проведения ПГД являются возраст пациента, отягощенный анамнез, неудачные попытки ЭКО в прошлом. Биология и генетика эмбриона зависит как от качества ооцита, так и от качества сперматозоида [1].

Целью данной работы было проведение ПГД эмбрионов у пациентов, в ядрах сперматозоидов которых с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) было выявлено высокое содержание анеуплоидий хромосом X, Y, 18. Половые и 18-я хромосомы были выбраны для анализа спермы, как наиболее распространенные варианты анеуплоидий в ядрах сперматозоидов [2]. Показанием для проведения анализа спермы на наличие хромосомных аномалий являлись такие отклонения в спермограмме пациентов, как олиго- и тератозооспермия [3].

Объект и методы исследования. В ходе выполнения программ ЭКО процедуру ПГД прошло 25 пар. Средний возраст пациенток на момент обращения в клинику составил $33 \pm 3,3$ года. Всем партнерам в парах был проведен анализ

спермы методом FISH и выявлены хромосомные аномалии в ядрах сперматозоидов половых и 18 хромосом. Средний возраст обследованных мужчин составил $36,7 \pm 3,8$ лет. Для контролируемой стимуляции овуляции (КСО) пациенток применяли длинный протокол с а-ГнРГ. Для поддержки лютеиновой фазы применяли препараты прогестеронового ряда. Полученные после трансвагинальной пункции ооциты и зиготы в течение двух дней культивировались в средах Universal IVF Medium (Medicult). Эмбрионы, начиная с третьего дня развития и до стадии бластоцисты, культивировались в среде BlastAssist (Medicult). Ооциты и полученные после оплодотворения эмбрионы культивировались при температуре $36,8 \text{ C} - 37,0 \text{ C}$; при содержании CO_2 5,5%.

Биопсия blastомеров проводилась на 3-й день после трансвагинальной пункции, при достижении эмбрионов 6-8-бластомерной стадии развития. Биопсию проводили в фосфатном буфере, не содержащем ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (Biopsy Medium, Medicult) [5]. Отверстие в зоне пеллюцида было выполнено с помощью лазерной установки OSTAХ LaserShot (MTG, Германия). Blastомер из эмбриона извлекали с помощью механических микроманипуляторов (Narishige, Япония) и микропипеток для биопсии (Cook). Эмбрионы после

биопсии культивировались в среде BlastAssist (Medicult) в отдельных каплях по 25 мкл.

ПГД с помощью метода FISH была выполнена по стандартному протоколу, рекомендуемому Abbott-Vysis (США). Биопсированные blastомеры отдельно помещались на стекла Superfrost Plus (Kindler GmbH, Германия) в гипотонический раствор 1M HCL и 1% Tween 20 (Sigma) [3, 4]. Ядра blastомеров были зафиксированы с помощью этанол/уксусного фиксатора при соотношении 3:1. Изучение хромосомных аномалий в ядрах blastомеров по X, Y, 18-й и 21-й хромосомам проводилось с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (Vysis, США). Результаты ПГД были зафиксированы с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i и цитогенетической программы Lucia FISH (Laboratory Imaging LTD, Чехия).

Перенос эмбрионов в полость матки выполнялся на пятый день развития эмбриона на стадии blastоцисты или морулы.

Результаты исследований и их обсуждение. Процедуру ПГД в программе ЭКО прошло 25 пар. Всего было исследовано 86 эмбрионов. Для проведения ПГД отбирались эмбрионы наиболее высокого качества. Хромосомные аномалии были обнаружены у 17 эмбрионов (19,76% всех исследованных эмбрионов). При этом 3 пациентов (12%) все проанализированные эмбрионы содержали хромосомные аномалии. У 19 эмбрионов (22,1%) ядра в blastомерах отсутствовали. 10 ядер (11,6% ядер) было разрушено при проведении ПГД. Реакция прошла в 91,9% случаев. Особенности анеуплоидий 17-ти аномальных эмбрионов представлены в **таблице 1**. Фотографии отдельных анеуплоидий представлены на **рис. 1-3**.

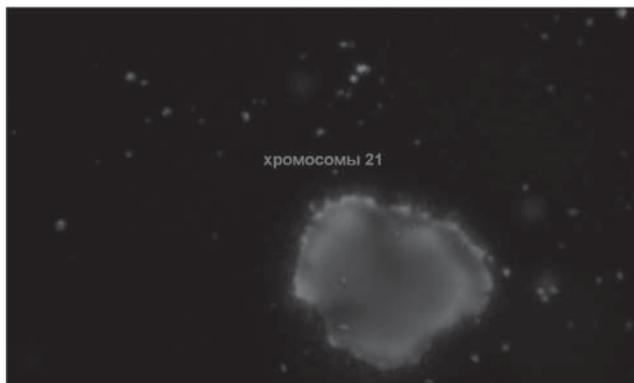


Рис. 1. Тетрасомия по хромосоме 21 (хромосомы 21-красный сигнал)

После биопсии положительная динамика наблюдалась у 76% эмбрионов. Для переноса в полость матки были отобраны только эмбрионы с нормальным количеством хромосом. После получения результатов ПГД было проведено 19 переносов. Процент наступления беременности составил 21% (4 беременности).



Рис. 2. Моносомия по половым хромосомам (хромосома X – синий сигнал)

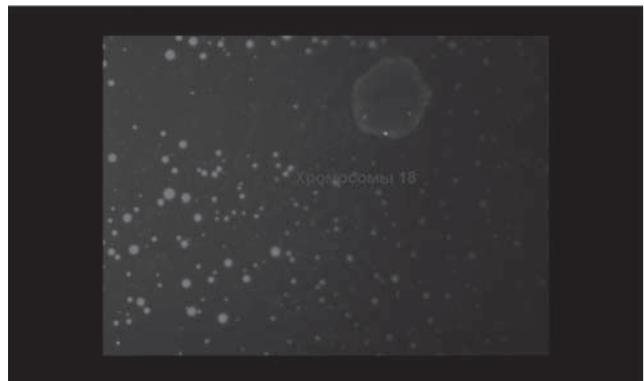


Рис. 3. Трисомия по хромосоме 18 (хромосома 18 – синий сигнал)

Таблица 1

Результаты обнаруженных анеуплоидий

Характер анеуплоидий	Количество аномальных эмбрионов, n	Количество аномальных эмбрионов, %
Количественные нарушения половых хромосом	12	70,6
Анеуплоидии аутосом	4	23,6
Анеуплоидии половых хромосом и аутосом	1	5,8

Выводы. Данная работа подтверждает необходимость проведения ПГД с целью анализа анеуплоидий у эмбрионов по хромосомам 18, 21, X, Y при обнаружении хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов пациентов с олиго- и тератозооспермией. Быстрота проведения ПГД методом FISH позволяет повысить вероятность рождения здорового ребенка после проведения программы ЭКО. Данное исследование показывает, что наиболее частыми являются анеуплоидии половых хромосом. Поэтому анализ половых хромосом при проведении ПГД необходимо рас-

сматривать как обязательный тест при наличии показаний в ходе программы ЭКО.

Перспективы дальнейших исследований. Учитывая прямую зависимость между наличием анеуплоидий у эмбрионов по хромосомам 18, 21, X, Y и обнаружением хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов пациентов с олиго- и тера-тозооспермией, перспективным является расширить спектр исследуемых хромосом с целью преимплантационной генетической диагностики. Интересна возможность исследования корреляции результатов ПГД после биопсии эмбрионов на третий день и биопсии на стадии бластоцисты (на пятые сутки развития эмбрионов) для изучения частоты мозаицизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Материалы XXV научной сессии НИИ акушерства и гинекологии.- М. : Под редакцией Э.К.Айламазяна, 1996-1997. – с.17 – 19
2. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. – 2-е изд., доп. – М.: Медицинскоу информационное агентство, 2004. – 782 с.
3. Alan R. Thornhill, Karen S. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis// Journal of Molecular Diagnosis.-2002.-Vol. 4.-№ 1.-P.11-29.
4. Sarah E. D., Sean P.F., Colin D. M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // Molecular Human Reproduction.-1997.-Vol. 3.-№ 7.-P. 585-598.
5. Staessen C., Hortournaye H., Michiels A, Devroey P., Lierbaers I. PGD in 47, XXY Klinefelter's syndrome patients // Human Reproduction.-2003.-Vol. 9.-№ 4.-P. 319-330.

УДК 573.6:577.21-076

Феськов А.М., Феськова И.А., Жилкова Е.С., Грабарь В.В., Блажко О.В.

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭМБРИОНОВ ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО ХРОМОСОМАМ X, Y, 18

Резюме. Проведена преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) эмбрионов пациентов, в ядрах сперматозоидов которых с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) было выявлено высокое содержание анеуплоидий хромосом X, Y, 18. С помощью метода FISH проведен анализ эмбрионов на наличие анеуплоидий по хромосомам X, Y, 18 и 21. В полость матки были перенесены только эмбрионы с нормальным набором хромосом.

Ключевые слова: преимплантационная генетическая диагностика, анеуплоидии, FISH.

УДК 573.6:577.21-076

ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНА ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ЕМБРІОНІВ ПАЦІЄНТІВ З НАЯВНІСТЮ ХРОМОСОМНИХ АНЕУПЛОЇДІЙ У ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПО ХРОМОСОМАМ X, Y, 18

Феськов О.М., Феськова І.А., Жилкова Є.С., Грабарь В.В., Блажко О.В.

Резюме. Проведена передімплантаційна генетична діагностика (ПГД) ембріонів пацієнтів, у ядрах сперматозоїдів яких за допомогою метода флуоресцентної гібридизації in situ (FISH) було виявлено великий зміст анеуплоїдій хромосом X, Y, 18. За допомогою метода FISH проведено аналіз ембріонів на наявність анеуплоїдій по хромосомам X, Y, 18 й 21. У порожнину матки було перенесено лише ембріони з нормальним набором хромосом.

Ключові слова: передімплантаційна генетична діагностика, анеуплоїдії, FISH

UDC 573.6:577.21-076

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSTICS for EMBRYOS of PATIENTS with ANEUPLOIDIES of CHROMOSOMES X, Y, 18 in SPERMATOZOA NUCLEI

Feskov O., Feskova I., Zhylkova I., Grabar V., Blazhko O.

Summary. Preimplantation genetic diagnostics of embryos for patients with chromosomal anomalies in spermatozoa nuclei of chromosomes X, Y, 18 found by FISH method was carried out. Embryos' examination on chromosomes X, Y, 18, 21 was carried out using FISH method. Only normal embryos were transferred to uterus cavity.

Key words: preimplantation genetic diagnostics, aneuploidies, FISH.

Стаття надійшла 15.01.2011 р.