

УДК: 57.085.23+57.03

ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КОТІВ У КУЛЬТУРІ ЗАЛЕЖНО ВІД КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

В. В. Ковпак, О. С. Ковпак

e-mail: kovpak8887@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

У статті наведені результати досліджень щодо впливу складу культурального середовища на проліферативну активність стовбурових клітин кісткового мозку котів. Експерименти проведені на тваринах із дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010 р.). Стовбурові клітини отримували з аспірату вмістимого кістково-мозкової порожнини стегнових кісток kota. Для визначення оптимальних умов культивування осад клітин переносили у три різні за складом культуральні середовища. З метою визначення найбільш ефективного з наведених нижче середовищ клітини пересаджували в кількості 400 тис/чашку (посадкова щільність 44 тис/см²) для кожного культурального середовища:

1. ДМЕМ (середовище Ігла модифіковане Дюльбеко) (D5648; SIGMA США) та FBS (фетальна сироватка телят) – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³;
2. ДМЕМ (D5796; SIGMA США) та FBS – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³;
3. ДМЕМ F12 (D8437; SIGMA США) та FBS – 20 % з додаванням антибіотику-антимікотику 10 мкл/см³.

Підрахунок кількості клітин здійснювали на 3 добу культивування у лічильній камері Горяєва, після утворення в одній із чашок моношару. Результати дослідження оцінювали за зміною індексу проліферації.

Індекс проліферації клітин за використання ДМЕМ (D5648) становив 2,1, що свідчить про подвоєння клітинної маси з моменту пасажування (кількість клітин складало 840±23 тис). При використанні ДМЕМ (D5796), індекс проліферації на третю добу становив 1,43 (кількість клітин складала 570±19 тис). За використання ДМЕМ F12 (D8437) відмічали значну кількість відкріплених клітин, після підрахунку клітин відмічали меншу кількість адгезованих клітин у порівнянні з їх посадковою кількістю, що підтверджується індексом проліферації, який складав 0,74.

При порівняльному аналізі трьох культуральних середовищ було встановлено, що достовірно найвищий індекс проліферації при культивуванні стовбурових клітин культури кісткового мозку kota спостерігається у середовищі, яке містило у своєму складі ДМЕМ (D5648).

Ключові слова: стовбурові клітини, кістковий мозок, коти, проліферативна активність.

Постановка проблеми

Стовбурові клітини (СК) – це недиференційовані клітини, що здатні до самовідновлення і диференціювання в різні типи клітин, а також до експресії маркерів, характерних недиференційованим клітинам [7]. Перспективи успішного їх використання у ветеринарній медицині значною мірою залежать від результатів ґрунтового вивчення їх властивостей загалом та умов культивування зокрема.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Незважаючи на численні публікації щодо властивостей стовбурових клітин у світі, досліджень з цього питання у ветеринарній медицині України обмаль [1, 2, 3, 5]. Варто зазначити, що досліджено вплив комбінації сироваток різних видів тварин, з додаванням

промислового культурального середовища, на проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку [6]. Проте промислові культуральні середовища відрізняються за своїм якісним і кількісним складом, що також може впливати на проліферативну активність клітин у культурі.

Зважаючи на вищесказане, ми вирішили порівняти вплив доступних промислових культуральних середовищ на проліферативну активність стовбурових клітин кісткового мозку котів, адже подібні дані відсутні у доступних нам літературних джерелах.

Мета, завдання та методика досліджень

Метою нашої роботи було порівняння впливу різних культуральних середовищ на проліферативну активність стовбурових клітин кісткового мозку котів у культурі.

Експерименти проведені на тваринах із

дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010 р.). Стовбурові клітини отримували з аспірату вмістимого кістково-мозкової порожнини стегнових кісток kota. Після чого до аспірату додавали фосфатно-буферний розчин (“Sigma”, США) 1:1, центрифугували протягом 5 хв за відцентрової силі 300 g. Зливали надосадову рідину, до осаду клітин додавали поживне середовище. Одержану клітинну масу культивували в стандартному середовищі: 80 % – середовище Ігла модифіковане Дульбекко (DMEM); 20 % – фетальна сироватка телят (FBS); 10 мкл/см³ – антибіотика-антимікотика (“Sigma”, США). Культивування проводили у CO₂ інкубаторі за температури 37 °C та 5 % концентрації CO₂, до утворення моношару 90–100 %. Після отримання на 16 день моношару клітини знімали з культурального посуду за допомогою стандартного розчину трипсин/ЕДТА, центрифугували, а осад пересаджували [8, 4].

Для визначення оптимальних умов культивування осад клітин переносили у три різні за складом культуральні середовища. З метою визначення найбільш ефективного з наведених нижче середовищ за індексом проліферації клітини пересаджували в кількості 400 тис/чашку (посадкова щільність 44 тис/см²) для кожного культурального середовища:

1. DMEM (D5648; SIGMA США) та FBS – 20 % з додаванням антибіотику-антимікоту 10 мкл/см³ (n = 3);

2. DMEM (D5796; SIGMA США) та FBS – 20 % з додаванням антибіотику-антимікоту 10 мкл/см³ (n = 3);

3. DMEM F12 (D8437; SIGMA США) та FBS – 20 % з додаванням антибіотику-антимікоту 10 мкл/см³ (n = 3).

Підрахунок кількості клітин здійснювали на 3 добу культивування у лічильній камері Горяєва, після утворення в одній із чашок моношару. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Результати досліджень

Результати дослідження впливу культурального середовища на проліферативну активність клітин культури стовбурових кісткового мозку kota наведені у таблиці 1 та рис. 1.

Таблиця 1. Проліферативна активність стовбурових клітин кісткового мозку kota в культурі за культивування в різних культуральних середовищ (M±m, n = 3)

Показники	DMEM (D5648)	DMEM (D5796)	DMEM/F12 (D8437)
К-ть клітин (3 доба)	840±23 тис ***	570±19 тис ***	269±19 тис **
Індекс проліферації	2,10	1,43	0,74

Примітка * - P<0,05; ** - P< 0,01; *** - P< 0,001 (контроль – посадкова кількість клітин).

Як видно з результатів дослідження, наведених в таблиці 1, культуральне середовище впливає на проліферативну активність стовбурових клітин кісткового мозку kota.

Так, у першому культуральному середовищі, яке містило DMEM (D5648), на третю добу культивування відмічали формування щільного моношару з конfluентністю 95–98 %. При цьому, клітини були невеликих розмірів (рис. 1, а).

Підрахунок кількості клітин підтвердив дані, отримані візуально. Так, індекс проліферації клітин за використання даного складу культурального середовища становив 2,1, що свідчить про подвоєння клітинної маси з моменту висівання (кількість клітин складало 840±23 тис.

При культивуванні стовбурових клітин кісткового мозку kota у культуральному середовищі, яке містило DMEM (D5796), на третю добу відмічали, що індекс проліферації становив 1,43. При цьому, конfluентність моношару становила 40–45 %. (рис. 1, б). Кількість клітин за використання вказаного культурального середовища зросла до 570±19 тис, що, у свою чергу, на 32% нижче, ніж цей показник за додавання у культуральне середовище DMEM (D5648).

На 3 добу культивування стовбурових клітин культури кісткового мозку kota з використанням DMEM F12 (D8437) відмічали значну кількість відкріплених клітин, які плавали у культуральному середовищі. Після промивання культури фосфатно-буферним розчином було виявлено незначну кількість адгезованих клітин, які, у свою чергу, були розпластані на культуральному пластику.

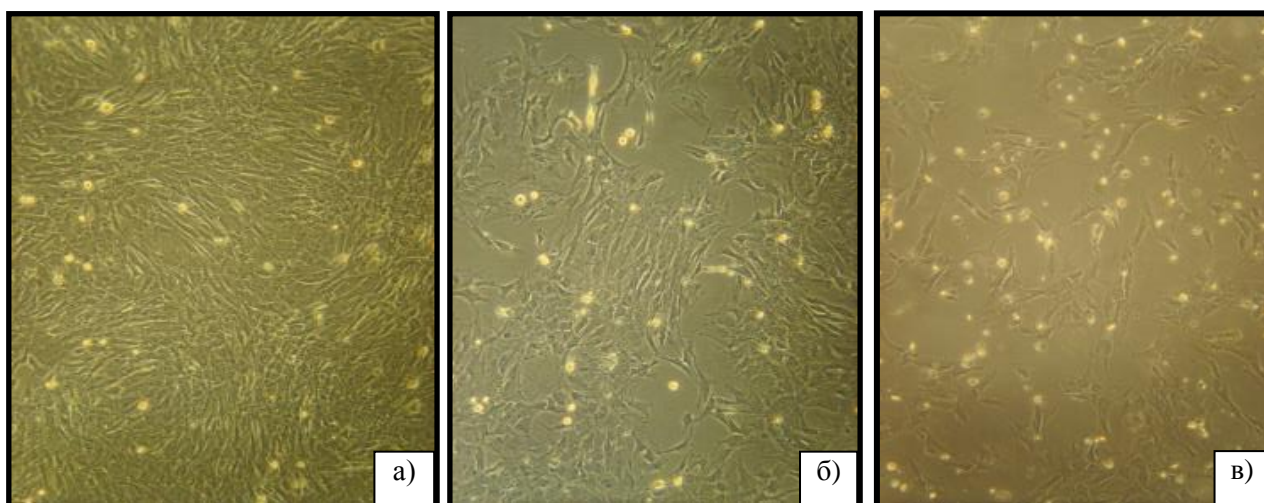


Рис. 1. Мікрофотографія стовбурових клітин культур кісткового мозку kota, 3 доба культивування у різних середовищах (I пасаж): а) ДМЕМ (D5648); б) ДМЕМ (D5796); в) ДМЕМ F12 (D8437). Нативний препарат. Зб.: ×100.

Після підрахунку клітин відмічали меншу кількість адгезованих клітин у порівнянні з їх посадковою, про що свідчить індекс проліферації 0,74. Конфлуентність моношару становила 20–25 % (рис. 1, в). Кількість клітин, у культурі, що культивувалася у середовищі з додаванням ДМЕМ F12 (D8437) на 3 добу, складала 269 ± 19 тис, що на 68% нижче, ніж у середовищі з додаванням ДМЕМ (D5648).

Варто зазначити, що у групі чашок з ДМЕМ F12 (D8437) спостерігали швидку зміну рН середовища у кислую сторону та відкріплення клітин від культурального пластику, що свідчить про неспроможність даного культурального середовища підтримувати оптимальне для культури стовбурових клітин kota рН. Отримані дані вказують на негативний вплив зміщення рН в кислую сторону для даної культури, що стало причиною низької проліферативної активності клітин за використання ДМЕМ F12 (D8437).

У той час відмінність культурального середовища ДМЕМ (D5648) та (D5796) полягає у наявності у середовищі піридоксалу чи піридоксину відповідно. Згідно з даними Sigma піридоксин виступає антиоксидантом та не утворює основи Шиффа і є відносно стабільним у середовищі, у той час як піридоксал має форму альдегіду та реагує з первинними амінами (амінокислоти), утворюючи основи Шиффа. Піридоксильні основи Шиффа неферментативно дезагрегують амінокислоти (та інші первинні

аміни) у середовищі культури клітин. Описані відмінності дії піридоксину та піридоксалу у культуральному середовищі суттєво вплинули на проліферативну активність стовбурових клітин kota.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Культивування стовбурових клітин кісткового мозку у середовищі зі складом ДМЕМ (D5648) 80%, ЕСТ 20 % з додаванням антибіотика-антимікотика 10 мкл/см^3 забезпечує найвищу їх проліферативну активність. Варто зазначити, що зміна рН середовища у кислую сторону призводить до втрати клітинами адгезивних властивостей.

Отримані дані дозволяють оптимізувати умови культивування стовбурових клітин kota, задля подальшого їх використання у клітинній терапії.

References

1. Bobos, O. L. (2013). Eksperymentalne obgruntuvannya efektyvnosti zastosuvannya stovburovykh klityn dlia korektsii patolohichno zminenykh tkanyn nyrky u dribnykh domashnikh tvaryn [Experimental substantiation of efficiency of stem cell application for correction of pathologically altered kidney tissues in small pet animals]. (Disertatsiya kandidata veterynarnykh nauk). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv [in Ukrainian].

2. Zhurba, V. I. (2013). Naukovo-eksperymentalne obgruntuvannia efektyvnosti zastosuvannia stovburovykh klityn dlia vidnovlennia patolohichno zminenoho suhlobovoho khriashcha u tvaryn [Scientific and experimental substantiation of efficiency of stem cell application for restoration of pathologically modified articular cartilage in animals]. (Disertatsiya kandidata veterynarnykh nauk). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv [in Ukrainian].

3. Zoltan, N. I. (2013). Eksperymentalne obgruntuvannia efektyvnosti zastosuvannia stovburovykh klityn dlya korektsiyi patolohichno zminenykh tkanyh pechinky u dribnykh domashnikh tvaryn [Experimental substantiation of efficiency of stem cell application for correction of pathologically altered liver tissues in small pet animals]. (Disertatsiya kandidata veterynarnykh nauk). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv [in Ukrainian].

4. Masurkewitsch, A. J., Kowpak, V. V. & Danilow, W. B. (2014). Klitynni tekhnolohii u veterynarnii medytsyni [Cellular technologies in veterinary medicine. Manual]. Kyiv: KOMPRINT [in Ukrainian].

5. Malyuk, M. O. (2016). Vlastyvoli stovburovykh klityn ta naukovo-eksperymentalne obgruntuvannia yikh zastosuvannia u veterynarnii medytsyni [Properties of stem cells and scientific and experimental substantiation of their application in veterinary medicine]. (Disertatsiya doktora veterynarnykh nauk). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv [in Ukrainian].

6. Moskalova, K. O. & Malyuk, M. O. (2016). Vplyv kombinatsii syrovatok riznykh vydiv tvaryn na efektyvnist klonuvannia pervynnykh multipotentnykh stovburovykh klityn kistkovoho mozku kroliv [Influence of a combination of sera of different animal species on the efficiency of cloning primary multipotent stem cells of bone marrow of rabbits]. *Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy*, 3, 9 [in Ukrainian].

7. Repin, V. S. (2001). *Embrionalnaya stvolovaya kletka: ot fundamentalnykh issledovaniy v kliniku* [Embryonic stem cell: from basic research to the clinic]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*, 2, 3-8 [in Russian].

8. Ian, Freshney R. (2005). Culture of animal cells: a manual of basic technique (5th ed). USA: John Wiley & Sons.

PROLIFERATIVE ACTIVITY STEM CELLS OF CULTURE BONE MARROW IN DEPENDENCE FROM CULTURAL MEDIUM

V. V. Kovpak, O. S. Kovpak

e-mail: kovpak8887@gmail.com

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Heroyiv Oborony, 15, Kyiv. 03041, Ukraine

The article presents the results of research the influence composition culture medium on proliferative activity stem cells of bone marrow a cat.

Animal experiments were conducted in compliance with the requirements of the law of Ukraine "On the protection of animals from cruelty" (2010).

The stem cells bone marrow was obtained from aspirates of the contents cavity of femur bone a cat. To determine the optimal conditions of culture, cell precipitates were transferred into three different compositions culture medium. In order to determine the most effective of the following mediums, cells were replaced in an amount of 400 thou. in cup (landing density 44 thou./ cm²) for each culture medium:

1. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (D5648; SIGMA USA) and FBS (fetal bovine serum) - 20% with supplement antibiotic-antimycotic 10 µl / cm³;

2. DMEM (D5796; SIGMA USA) and FBS - 20% with supplement antibiotic-antimycotic 10 µl / cm³;

3. DMEM F12 (D8437; SIGMA USA) and FBS - 20% with supplement antibiotic-antimycotic 10 µl / cm³.

Counting of the number of cells was made after 3 days of cultivation in a counting chamber Goryaev, after formation in one of the cups of the monolayer. The results of research were evaluated by the change the index of proliferation .

The cell proliferation index at using DMEM (D5648) was 2.1, this confirmed doubling the cell mass from the time of sowing (the number of cells was 840 ± 23 thou.). When we using DMEM (D5796), the proliferation index for the third day was 1.43 (the number of cells was 570 ± 19 thou.). When used DMEM F12 (D8437), we were noted significant amount detachments of cell. After counting, were observed fewer adhesive cells compared with a landing number. The data received

confirmed the proliferation index, which was 0.74.

In comparative analysis of three culture media, we were found that the highest index of proliferation in the cultivation of stem cells bone marrow in the culture a cat was observed in a medium containing DMEM (D5648) in its composition.

Keywords: stem cells, bone marrow, cat, proliferative activity

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КОШЕК В КУЛЬТУРЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

В. В. Ковпак, О. С. Ковпак

e-mail: kovpak8887@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и
природопользования Украины

Героев Оборона, 15, г. Киев, 03041, Украина

В статье приведены результаты исследований влияния состава культуральной среды на пролиферативную активность стволовых клеток костного мозга кошек. Эксперименты проведены на животных с соблюдением требований Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» (Ведомости ВР 2010 г.). Стволовые клетки получали из аспирата содержимого костно-мозговой полости бедренных костей кошек. Для определения оптимальных условий культивирования осадок клеток переносили в три разные по составу культуральных среды. С целью определения наиболее эффективной из приведенных ниже сред клетки пересаживали в количестве 400 тыс./чашку (посадочная плотность 44 тыс/см²) для каждой культуральной среды:

1. ДМЕМ (среда Игла модифицированная Дюльбеко) (D5648; SIGMA США) и FBS (фетальная сыворотка телят) – 20% с добавлением антибиотика-антимикотика 10 мкл см³;

2. ДМЕМ (D5796; SIGMA США) и FBS – 20% с добавлением антибиотика-антимикотика 10 мкл / см³;

3. ДМЕМ F12 (D8437; SIGMA США) и FBS – 20% с добавлением антибиотика-антимикотика 10 мкл / см³.

Подсчет количества клеток осуществляли на 3 сутки культивирования в счетной камере Горяева, после образования в одной из чашек монослоя. Результаты исследования оценивали после изменения индекса пролиферации.

Индекс пролиферации клеток при использовании ДМЕМ (D5648) составил 2,1, что свидетельствует об удвоении клеточной массы с момента посева (количество клеток составляло 840 ± 23 тыс). При использовании ДМЕМ (D5796), индекс пролиферации на третьи сутки составил 1,43 (количество клеток составило 570 ± 19 тыс). При использовании ДМЕМ F12 (D8437) отмечали значительное количество откреплений клеток, после их подсчета отмечали меньшее количество адгезированных клеток по сравнению с посадочной, что подтверждает индекс пролиферации, который составлял 0,74.

При сравнительном анализе трех культуральных сред установлено, что достоверно самый высокий индекс пролиферации при культивировании стволовых клеток культуры костного мозга кота наблюдается в среде, содержащей в своем составе ДМЕМ (D5648).

Ключевые слова: стволовые клетки, костный мозг, коты, пролиферативная активность.