

ДРОМАШКО С.Е., БАЛАШЕНКО Н.А., ШЕВЦОВА С.Н., ШЕЙКО Я.И.*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,**Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by**✉ S.Dromashko@igc.by, +375 (17) 284-21-90, +375 (29) 666-69-34*

НЕИНВАЗИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК ИЗ УРИНЫ ЧЕЛОВЕКА В ЦЕЛЯХ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Развитие биотехнологии, клеточной и молекулярной биологии во многом определило успех и перспективы клеточных технологий, развитие которых направлено на совершенствование таких практически важных областей, как медицинская диагностика, тестирование фармакологических средств и аутологичная трансплантация.

Разработка методов получения и культивирования клеток человека для медицинской трансплантации является важнейшей проблемой регенеративной медицины, которая включает разработку и использование методов восстановления пораженной болезнью или поврежденной (травмированной) ткани с помощью клеточной терапии – трансплантации клеток. При этом особенно важно использовать методы получения клеточных культур из гомологичного (собственного) материала данного индивидуума, поскольку при этом обеспечивается иммунологическая безопасность клеточной трансплантации.

В настоящее время ведутся активные поиски эффективных и нетравматичных методов получения стволовых клеток человека для целей регенеративной медицины. В качестве потенциального источника данных клеток, способных дать начало практически любой ткани, все чаще избираются клетки, имеющиеся в биологических средах – крови, моче, выделение которых не связано с нежелательным хирургическим вмешательством. В силу этого урина человека представляет собой перспективный источник получения стволовых клеток для последующего применения в клинической медицине. За последние годы в мировой литературе появился ряд публикаций, свидетельствующих о реальной возможности получения культуры клеток из урины человека [1, 2].

Материалы и методы

Забор образцов урины. Исследования проводили с использованием образцов урины, взятых у 50 здоровых беременных женщин в возрасте от 15 до 30 лет с любезного разрешения главного врача УЗ «Клинический родильный дом Мин-

ской области» и персонала родильного отделения. Также проводили исследования с использованием образцов урины, взятых у 6 здоровых мужчин. Объем пробы урины, взятой от каждого донора, составлял 50 мл. Образцы биоматериала были доставлены в лабораторию в течение 1 часа от момента забора в стерильных контейнерах из полипропилена.

Первичная обработка биологического материала раствором антибиотиков. Свежую урину, разлитую в центрифужные пробирки емкостью 15 мл, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку прибавляли по 2–15 мл раствора RPMI [3]. Для предварительной обработки биоматериала при получении культур клеток из урины человека использовали 2 подхода. Первый подход заключался в пролонгированной обработке биоматериала антибиотиками в среде RPMI. Для подбора режимов обработки биоматериала варьировали сочетания антибиотиков, время обработки, а также объем раствора антибиотиков. Для обработки использовали растворы пенициллина, стрептомицина, амфотерицина В, гентамицина и их сочетания в концентрации каждого антибиотика в растворе RPMI 5 мкг/мл. Время обработки варьировали от 10 минут до 4-х часов. Объем антибиотиков варьировали от 2 до 15 мл раствора. Однако ни один из режимов обработки антибиотиками не оказался достаточно эффективным, т.к. не предотвращает бактериальную контаминацию. Бактериальные заросты наблюдались на следующий день после начала культивирования, что не позволяло оценить жизнеспособность клеток даже на раннем этапе получения культуры клеток. Это свидетельствовало о зараженности биоматериала бактериями, устойчивыми к используемым антибиотикам. Более эффективным оказался второй подход – метод многократной промывки биоматериала средой RPMI без антибиотиков. В этом случае промывку антибиотиками не исключали полностью, однако время обработки сократили, ресуспендируя клетки

в растворе RPMI с пенициллином и стрептомицином в концентрации 5 мкг/мл, и использовали этот способ обработки после пяти процедур отмывки.

Первичная обработка биологического материала методом многократной промывки биоматериала средой RPMI. Каждый образец свежей урины человека (50 мл) разделяли на 4 части, разливая по 12,5 мл в центрифужные пробирки емкостью 15 мл, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку прибавляли по 2 мл нагретой до 37°C среды RPMI, аккуратно ресуспензировали дозатором 20 раз и объединяли образцы, взятые от одного человека. К образцам добавляли по 7 мл нагретой до 37°C среды RPMI для получения 15 мл в каждой пробирке, ресуспензировали и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. После центрифугирования проводили процедуру отмывки, повторяя ее 5 раз: надосадочную жидкость аккуратно забирали дозатором, к осадку прибавляли по 15 мл нагретой до 37°C среды RPMI. Содержимое пробирки аккуратно ресуспензировали дозатором 20 раз. Затем пробирки центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. После пяти процедур отмывки проводили обработку биоматериала антибиотиками: надосадочную жидкость аккуратно забирали дозатором, к осадку прибавляли по 15 мл среды RPMI с 10-кратным содержанием антибиотиков по сравнению со средой для культивирования (5 мкг/мл пенициллина и стрептомицина), аккуратно ресуспензировали 20 раз, затем центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. После центрифугирования пробирки с внешней стороны полностью обрабатывали этиловым спиртом 96 % концентрации для стерилизации и вносили в стерильный бокс. После этого промывочную жидкость RPMI сливали только в стерильных условиях для предотвращения бактериальной контаминации. Затем проводили процедуру отмывки, каждый раз обрабатывая пробирки этиловым спиртом перед внесением в бокс. Всю процедуру повторяли еще 5 раз: надосадочную жидкость аккуратно забирали дозатором, к осадку прибавляли по 15 мл нагретой до 37°C среды RPMI. Содержимое пробирки аккуратно ресуспензировали дозатором 20 раз. Затем пробирки центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин.

После проведения процедуры отмывки надосадочную жидкость сливали и к осадку прибавляли по 2 мл среды для культивирования составом: 70 % среды DMEM/F12 [4]), 10 % эм-

бриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 10 % фолликулярной жидкости яичников коров, 10 % питательной среды DMEM, кондиционированной эмбриональными фибробластами мыши, пенициллин и стрептомицин (конечная концентрация антибиотиков в среде 0,5 мкг/мл). Осадок клеток ресуспензировали и переносили в сосуд Карреля. После добавления CO₂ (5 % от объема сосуда) с помощью шприца сосуд герметично закупоривали резиновой пробкой и культивировали клетки при 37°C.

Методика культивирования клеток, полученных из урины человека. Культивирование клеток проводили на среде DMEM/F12 с добавлением 10 % сыворотки эмбриона телят, 10 % фолликулярной жидкости яичников коров, 10 % питательной среды DMEM, кондиционированной эмбриональными фибробластами мыши, а также пенициллина и стрептомицина (0,5 мкг/мл). Использование фактора роста фибробластов (FGF) в конечной концентрации в среде 20 нг/мл при получении и культивировании клеток из урины человека не дало результатов. После добавления CO₂ (5 % от объема сосуда) с помощью шприца сосуд герметически закупоривали резиновой пробкой и культивировали клетки при 37°C. Пересев производили с использованием трипсинизации или путем переноса части культуральной среды, содержащей клетки во взвеси, в новый культуральный флакон. В дальнейшем в процессе культивирования анализировали культуру с помощью инвертированного микроскопа, а при нахождении отдельных клеток и небольших клеточных групп выполняли их компьютерную видеосъемку на комплексе компьютерной видеомикроскопии «ЦИТОМИР» [5] с целью проверки их жизнеспособности и пролиферативной активности.

Результаты и обсуждение

Большинство клеток, выделенных из урины человека, плоские, имеют неправильную форму, внутри клеток просматривается ядро. Внешне они выглядели точно так же, как на рисунках в статье китайских исследователей [6]. Однако с применением метода компьютерной видеомикроскопии было выявлено, что большинство клеток, полученных из урины человека, не являются жизнеспособными (они не обладают подвижностью и не делятся). Иногда в процессе видеонаблюдения удавалось обнаружить подвижную клетку в среде, однако эти клетки уходили из поля зрения. Для стимуляции адгезии кле-

ток использовали покрытие поверхности культурального сосуда Карреля матригелем, который оказался эффективным при получении клеток из фолликулов волос [7]. Вместе с тем в ходе работы с клетками из урины человека данный подход оказался нерезультативным, что может быть связано с отсутствием у данного типа клеток рецепторов к коллагену. Впервые подвижная клетка, прикрепленная к субстрату, была обнаружена на 4-е сутки культивирования. На 6-е сутки обнаружили несколько прикрепленных подвижных клеток, а также группу клеток во взвеси. На рис. 1 представлены отдельные кадры из видеофильма, демонстрирующие изменения положения и формы этих клеток. Кроме того, при видеонаблюдении было зафиксировано клеточное деление, что свидетельствовало о пролиферативной активности клеток.

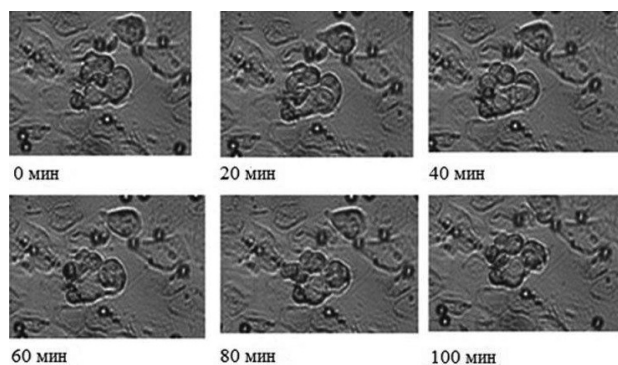


Рис. 1. Группа подвижных неприкрепленных клеток, полученных из урины человека

С целью оценки пролиферативного потенциала клеток, полученных из урины человека, использовали метод компьютерной видеомикроскопии. Для этого снятые трипсином клетки высевали в среде для культивирования при низкой плотности (1–20 клеток на 1 мм², концентрацию

Таблица

Динамика роста популяции клеток, полученных из урины человека

Сутки	1 участок, клетки	2 участок, клетки	3 участок, клетки	4 участок, клетки	5 участок, клетки
1-е	2	18	1	3	6
2-е	5	28	3	8	14
3-и	8	48	4	22	23
4-е	15	101	5	43	43
5-е	30	211	9	70	70
6-е	56	466	17	156	103
7-е	75	877	35	230	166

единичных клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева) в сосуды Карреля. Затем сосуд Карреля переносили в термостатируемую камеру компьютерного видеокomплекса «Цитомир». Ежедневно с помощью компьютерного видеокomплекса проводили подсчет клеток на пяти участках ростовой поверхности с единичными клетками и формирующимися клеточными клонами. В результате проведения наблюдений в течение недели были получены данные, представленные в табл. и на рис. 2.



Рис. 2. Динамика роста популяции клеток, полученных из урины человека на 5 различных участках ростовой поверхности (в сумме)

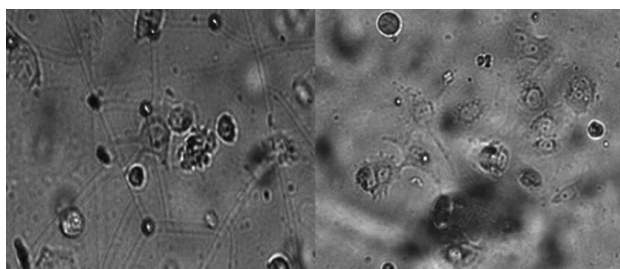


Рис. 3. Прикрепленные клетки с отростками, полученные из урины человека

После двух недель культивирования на дне сосудов Карреля обнаруживались клетки аномальной формы (рис. 3), что проявлялось в появлении тонких длинных выростов цитоплазмы. Эти клетки не делились и нередко достигали очень крупных размеров, что может свидетельствовать о появлении дифференцированных либо состарившихся клеток в клеточной популяции. Это является доказательством неиммортализованности полученной линии клеток.

Выводы

Показана возможность получения клоногенных клеток из урины человека, а также разработана соответствующая методика неинвазивно-

го получения первичной культуры клеток. Получена неиммортилизованная культура клеток из урины человека.

Установлено, что наиболее подходящим материалом для получения жизнеспособных клеток из урины человека является урина беременных женщин.

Выявлено, что наиболее эффективным способом предотвращения бактериального заражения полученных из урины клеток является метод многократной промывки биоматериала средой RPMI без антибиотиков.

Показана перспективность интенсификации исследования за счет параллельной (одновременной) видеозаписи многих участков клеточной культуры с помощью компьютерного видеокomплекса «Цитомир».

Работа выполнена в рамках задания 2.50 «Разработать технологию неинвазивного получения и молекулярно-генетического анализа культур клеток человека для регенеративной медицины» Государственной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий».

ЛИТЕРАТУРА

1. Стволовые клетки из мочи могут стать перспективным материалом для лечения многих заболеваний [Электронный ресурс] // LABSCIENCE.RU. Научно-познавательный on-line журнал. – 31.07.2013. – Режим доступа: <http://labscience.ru/2013/07/31/3066.html>.
2. Cai J., Zhang Y., Liu P., Chen S., Wu X., Sun Y., Li A., Huang K., Luo R., Wang L., Liu Y., Zhou T., Wei S., Pan G., Pe D. Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells // *Cell Regen. (Lond)*. – 2013. – 30, № 2 (1). – P. 6.
3. Cell Culture [Electronic resource] // SIGMA-ALDRICH. – 2016. – Mode of access: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/rpmi-1640.html>.
4. Classical Media and Salts [Electronic resource] // SIGMA-ALDRICH. – 2016. – Mode of access: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/dme-f12.html>.
5. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И., Балашенко Н.А., Дромашко С.Е. Видеомикроскопия живых клеток *in vitro* с помощью видеокomплекса «Цитомир»: методические рекомендации. – Минск, 2014. – 52 с.
6. Zhou T., Benda Ch., Duzinger S., Huang Y., Li X., Li Y., Guo X., Cao G., Chen Sh., Hao L., Chan Y.-Ch., Ng K.-M., Cy Ho J.C., Wieser M., Wu J., Redl H., Tse H.-F., Grillari J., Grillar-Voglauer R., Pei D., Esteban M.A. Generation of induced pluripotent stem cells from urine // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2011. – 22, № 7. – P. 1221–1228.
7. Eiselleová L., Peterková I., Neradil J., Slaninová I., Hampel A., Dvořák P. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells // *Int. J. Dev. Biol.* – 2008. – 52, № 4. – P. 353–363.

DROMASHKO S.E., BALASHENKO N.A., SHEVTSOVA S.N., SHEIKO Y.I.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: S.Dromashko@igc.by

NON-INVASIVE RECEIVING OF CELLS FROM HUMAN URINE FOR REGENERATIVE MEDICINE

Aim. The article deals with development of non-invasive technology of receiving and analyzing cells from human urine.

Methods. There are methods of isolation, purification, reproduction, and cultivation of urine cell cultures, as well as their analysis with a computer video microscopy. **Results.** The conditions for obtaining clonogenic cells from human urine were achieved, and appropriate technology was developed. It was found that the most suitable material for the production of viable cells from human urine is the urine of pregnant women. Proliferative capacity of isolated cells was assessed with the method of computer video microscopy. It was shown that cells derived from urine were aging after 2-week cultivation, and therefore not prone to immortalization i.e. suitable for use in research for regenerative medicine. **Conclusions.** Non-immortal cell culture from human urine is obtained. The most effective way to prevent bacterial contamination of the urine cells is determined. The prospects of intensification of research through video-computer complex «Tsitomir» are shown.

Keywords: cell culture, computer video microscopy, human urine, non-immortal cell culture, regenerative medicine.