

УДК: 602.9:611.018:618.58

Малюк М.О., к. вет. н., доцент ©

E-mail: nikolai_malyuk@mail.ru

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв оборони, 15; Київ, 03041, Україна***ПУПОВИННИЙ КАНАТИК – АЛЬТЕРНАТИВНЕ ДЖЕРЕЛО
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У СОБАК**

Мультіпотентні стовбурові клітини ссавців, відкриті російським вченим А. Я. Фриденштейном, отримують із різних джерел, зокрема, із кісткового мозку, жирової тканини, крові пуповини. Останнім часом виявлена значна зацікавленість до отримання мезенхімальних стовбурових фібробластоподібних клітин із пуповини новонароджених. Пуповинний канатик новонародженої тварини є багатим джерелом клітин з високою проліферативною здатністю. Процедура забору біологічного матеріалу не потребує додаткового хірургічного втручання і не несе будь-яких етичних обмежень. Ці клітини є аутологічними для новонародженого та його матері, і їх, так само, як і стовбурові гемопоетичні клітини із пуповинної крові, можна кріоконсервувати з метою подальшого використання у клітинно-регенеративній медицині при захворюваннях опорно-рухового апарату тварин. Аналіз результатів проліферативного потенціалу стовбурових клітин пуповини собак на 0 – VI пасажах показав, що за допомогою механічної дезагрегації тканин пуповидного канатика вдається отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та клоногенними властивостями. При цьому, ефект контактного гальмування росту клітинних культур пуповидного канатика проявлявся при наростанні клітинного моношару в культуральних чашках Петрі до 80 % конфлюентності.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, фібробластоподібні клітини, пуповинний канатик, механічна дезагрегація.

УДК: 602.9:611.018:618.58

Малюк Н.А.*Національний університет біоресурсів і природопользования Украины***ПУПОВИННИЙ КАНАТИК – АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ИСТОЧНИК
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТОЛОВОЙХ КЛЕТОК У СОБАК**

Мультіпотентные стволовые клетки млекопитающих, открытые русским ученым А.Я. Фриденштейном, выделяют из разных источников, в частности, из костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови. В последнее время проявляется значительная заинтересованность к выделению мезенхимальных стволовых фибробластоподобных клеток из пуповины новорожденных. Пуповинный канатик новорожденных животных является богатым источником клеток из высокой пролиферативной активностью. Процедура выделения биологического материала не нуждается в дополнительном хирургическом вмешательстве и не несет никаких этических

ограничений. Эти клетки являются аутологическими для новорожденного и его матери и их, так же как и гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови, можно криоконсервировать, с целью дальнейшего использования в клеточно-регенеративной медицине при патологии опорно-двигательного аппарата животных. Анализ результатов пролиферативного потенциала стволовых клеток пуповины собак на 0 –VI пассажах показывает, что с помощью механической дезагрегации тканей пуповинного канатика удастся получить фибробластоподобные клетки с высокими адгезивными и клоногенными свойствами. При этом, эффект контактного торможения роста клеточных культур пуповинного канатика проявляется при нарастании клеточного монослоя в культуральных чашках Петри до 80% конфлюентности.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, фибробластоподобные клетки, пуповинный канатик, механическая дезагрегация.

UDC: 602.9:611.018:618.58

M. O. Malyuk

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

UMBILICAL CORD – AN ALTERNATIVE SOURCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN DOGS

Multipotent stem cells of mammals was discovered by russian scientists A. Fridenshtein. They can be obtained from various sources, including bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood. Recently was indicated considerable interest in obtaining of mesenchymal stem cells from umbilical cord of newborns. Umbilical cord of a newborn animal is a rich source of cells with high proliferative capacity. The procedure of biological material sampling does not require additional surgery intervention and does not have any ethical restrictions. These cells are autologous to the newborn and his mother and, as well as hematopoietic stem cells from cord blood, can be cryopreserved for further usage in cell regenerative medicine for treating animals with musculoskeletal system diseases. Analysis of the proliferative potential of umbilical cord stem cells of dogs at 0 –VI passages showed that mechanical disaggregation of tissues allows to get a fibroblast-like cells with high adhesive and colony forming properties. Thus the effect of contact inhibition of cell growth in cell monolayer was manifested when 80 % of culture petri dishes square was filled.

Key words: mesenchymal stem cells, fibroblast-like cells, umbilical cord, mechanical disaggregation

Мезенхімальні фібробластоподібні стовбурові клітини, відкриті російським вченим А.Я. Фріденштейном [2], отримують із різних джерел, зокрема, із кісткового мозку, жирової тканини, крові пуповини [3, 4, 8, 9]. Останнім часом виявлена значна зацікавленість до отримання стовбурових фібробластоподібних клітин із пуповини новонароджених [1, 7]. Пуповинний канатик новонароджених легкодоступний, є багатим джерелом високопроліферативних клітин, а процедура відбору біологічного матеріалу не потребує додаткового хірургічного втручання і не має будь-яких етичних обмежень. Ці клітини є аутологічними для новонародженої тварини та її матері, їх також, як і стовбурові гемопоетичні клітини пуповидної крові, можна

кріоконсервувати і зберігати з метою подальшого застосування. Відомо, що стовбурові фібробластоподібні клітини пуповидного канатика здатні диференціюватись в кісткову, хрящову, жирову тканини [1], що дозволяє їх розглядати як альтернативний матеріал для відновлення структури і функції тканин опорно-рухового апарату тварин. Також встановлено, що МСК отримані із Вартонового студня диференціюються в нейрони і гліальні клітини [5]. Науково доведено, що СК пуповинного канатика не експресують комплексу гістосумісності ні I, ні II класу, що є важливим обґрунтуванням для подальшого клінічного їх застосування, оскільки відсутність комплексів гістосумісності забезпечує повне приживлення клітинного матеріалу у тварин – реципієнтів [6]. З огляду на це, існує висока ймовірність того, що стовбурові фібробластоподібні клітини пуповидного канатика здатні замінити МСК кісткового мозку, які нині активно використовуються для відновлення кісткових дефектів, суглобів, лікування серцево-судинної системи, травматичних ушкоджень шкіри тощо. Варто зауважити, що у ветеринарній медицині України такі дослідження проводяться вперше.

Враховуючи наведені вище факти, виділення мезенхімальних стовбурових клітин із пуповидного канатика тварин є досить актуальним і своєчасним завданням. Це дасть можливість зберігати їх в кріобанках клітинних культур, використовувати як аутологічний матеріал для клітинної терапії. Таким чином, МСК пуповини можуть стати ефективною альтернативою аналогічним клітинам, виділеним із кісткового мозку, жирової тканини і пуповинної крові тварин.

Мета дослідження: Вивчити особливості виділення та культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповидного канатика собак, а також зміни морфології отриманих клітинних культур залежно від довготривалості культивування *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Мезенхімальні клітини виділяли із матриксу (строми) пуповидного канатика собак. Останній отримували в процесі планового кесаревого розтину у собак різних порід (французький бульдог, англійський бульдог, чихуахуа) на 59 – 63 день гестації. Оперативне втручання проводили у Державній установі «Центр охорони здоров'я тварин в м. Києві» – клініці ветеринарної медицини Святошинського району м. Києва. Пуповину промивали фосфатно-буферним розчином (ФБР), відпрепаровували артерії і вени та подрібнювали пуповинний канатик за допомогою хірургічних ножиць на фрагменти розміром 2 – 3 мм, після чого піддавали механічній обробці на магнітній електромішалці (М-5, Україна) протягом 10 – 15 хв при кімнатній температурі. Отриману клітинну суспензію фільтрували через стерильний марлевий фільтр, центрифугували, осад клітин ресуспендували в поживному середовищі. Отриману суспензію клітинної маси висівали у культуральні чашки Петрі (d=60 мм) і культивували до отримання моношару 80 %-ої конфлюентності. Отриману культуру клітин пасажували.

Культивування клітин проводили за стандартною методикою в культуральних чашках Петрі та CO₂-інкубаторі (t 37°C, 5 % CO₂). Склад поживного середовища: 80 % – DMEM, 20 % – ембріональна сироватка теляти з додаванням 10 мкл/см³ середовища антибіотика-антимікотика. Заміну середовища проводили через кожні три доби. При досягненні моношару 80 % - ої конфлюентності, клітини переводили в суспензію, використовуючи 0,5/0,2 % - й розчин трипсину/ЕДТА і розсівали у співвідношенні 1 : 3. Готову культуру

клітин переносили для зберігання в посудині Дюара із рідким азотом. Перед кріоконсервуванням культуру клітин переносили у середовище, що складається із фетальної телячої сироватки та 10 % ДМСО.

Результати досліджень. Нами апробований метод виділення мезенхімальних стовбурових клітин із пуповидного канатика собак шляхом його механічної обробки. Встановлено, що за допомогою механічної дезагрегації тканин пуповидного канатика собак на магнітній електромішалці вдається отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та проліферативними властивостями.

В отриманій культурі МСК із пуповини собаки спостерігався високий рівень морфологічної гетерогенності цих клітин: поряд із ФБТ-подібними (фібробластоподібними) клітинами виявлені округлі клітини, прикріплені до культурального пластику, які, очевидно, є ендотеліальними клітинами (рис. 1б). На I – II пасажах округлі клітини витіснялись ФБТ – подібними клітинами. Наші дослідження узгоджуються із дослідженнями Бурунової В.В. (2011 р.) [1].

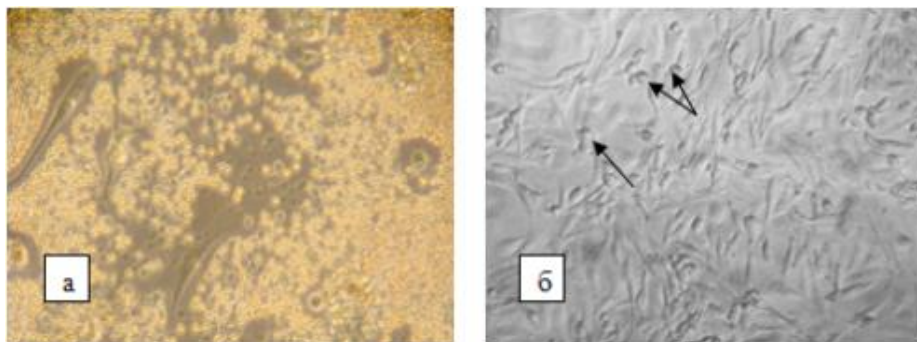


Рисунок 1 – Стівбурові клітини пуповини собаки (0 – й пасаж): а – третій день культивування; б – одинадцятий день культивування, $\times 100$.

В період адаптації на нульовому та першому пасажах ФБТ- подібні клітини із пуповини (рис. 1а, 2а) були морфологічно подібні і характеризувались розпластаною формою із приблизно однаковими розмірами в повздовжньому і поперечному напрямках. При цьому, їх форма значно відрізнялась від веретеноподібних клітин кісткового мозку (рис. 2а, б).

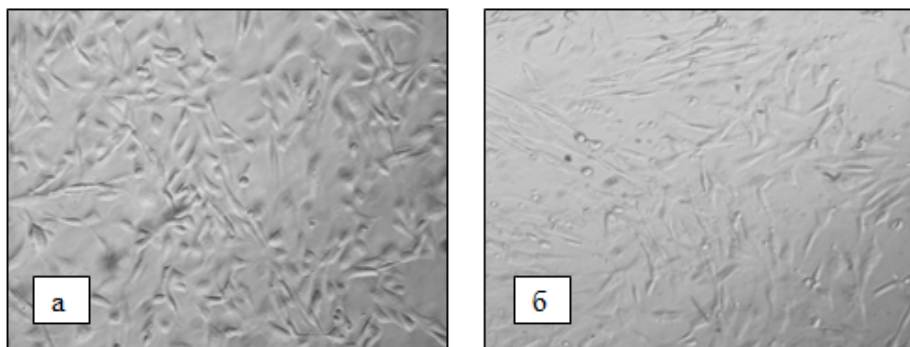


Рисунок 2 – Стівбурові клітини собаки (I – й пасаж): а – СК пуповини; б – СК кісткового мозку, $\times 100$.

При підвищенні конфлюентності в процесі росту клітинних культур до 85–100 % моношару в усіх випадках, незалежно від номеру пасажу, спостерігалось помітне зниження мітотичної активності клітинних культур МСК пуповини (рис 3). Разом з тим, до 80 % - ої конфлюентності контактне гальмування росту ФТП культур клітин не спостерігалось. Це, зокрема, обґрунтовує необхідність пересіву клітинних культур пуповидного канатика не пізніше досягнення ними 80 %-ої конфлюентності. Ефект контактного гальмування росту клітинних культур пуповидного канатика проявлявся не тільки при наростанні гомогенного клітинного моношару в культуральних чашках Петрі на першому і наступних пасажах, але і в окремих колоніях росту на 0 пасажі.

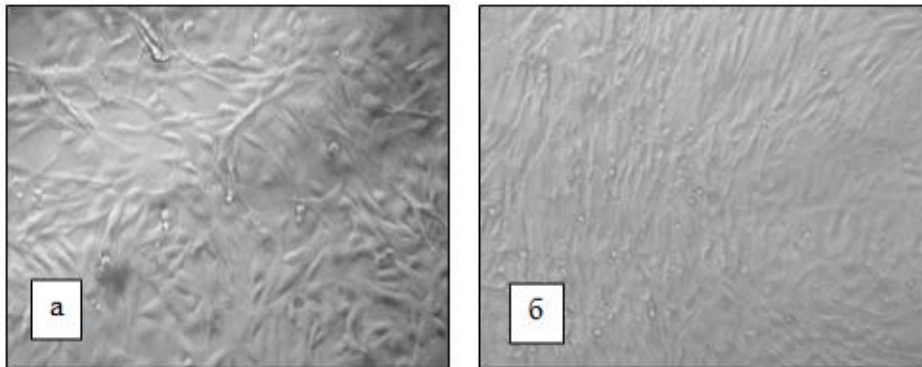


Рисунок 3 – Моношар клітин собаки (III – й пасаж): а – 80 % конфлюентності; б – 100 % конфлюентності, × 100.

Після II пасажу культура МСК із пуповини ставала морфологічно гомогенною і містила, в більшості, невеликі мітотично активні веретеноподібні клітини (рис. 3).

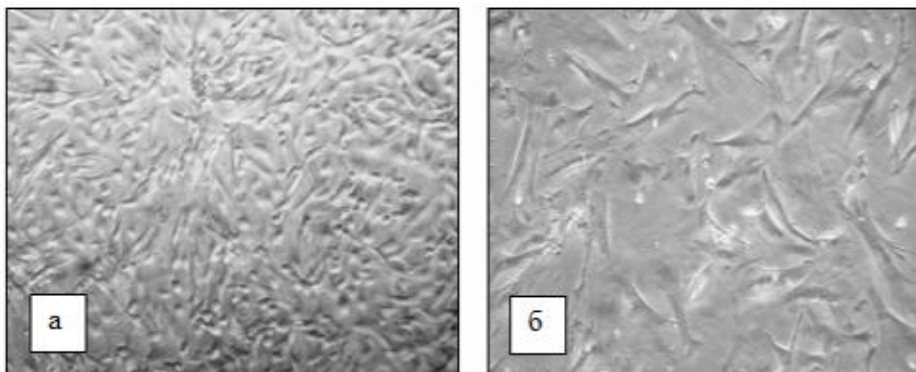


Рисунок 4 – Стовбурові клітини пуповини собаки: а – IV-й пасаж; б – VI пасаж, ×100.

З часом в культурі клітин відбувався зворотний процес: після декількох (від V до VI) пасажів клітини поступово втрачали свою мітотичну активність, в

культури знову з'являлись розпластані клітини великих розмірів (рис. 4б) і ріст клітинної популяції практично зупинявся.

Висновки:

1. Встановлено, що за допомогою механічної дезагрегації тканин пуповидного канатика собак вдається отримати фібробластоподібні клітини з високими адгезивними та проліферативними властивостями.

2. Ефект контактного гальмування росту клітинних культур пуповидного канатика проявлявся при наростанні клітинного моношару в культуральних чашках Петрі до 80 % конфлюентності.

Перспективи подальших досліджень будуть спрямовані на вивчення імунофенотипового профілю, а також каріотипової стабільності мезенхімальних стовбурових клітин пуповидного канатика собак на різних пасажах культивування *in vitro*.

Література

1. Бурунова В. В. Проблемы стандартизации при получении клеточных культур мезенхимального происхождения: экспериментальный и теоретический анализ. Автор. дис. канд. биол. наук. / Бурунова В. В. // -Москва, 2011. – 27 с.
2. Лупатов А.Ю. Цитофлюорометрический анализ фенотипов фибробластоподобных клеток из костного мозга и пуповины человека /Лупатов А.Ю., Каралкин П.А., Суздальцева Ю.Г., Бурунова В. В., Ярыгин К.Н.// Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 4. – С. 1–8.
3. Фриденштейн А.Я. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворных тканей морских свинок. / Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. // Цитология. – 1970. – №12. – С. 1147—1155.
4. Broxmeyer H.F. Cord blood stem cell and progenitor cells. / Broxmeyer H.F., Srouf E., Orschell C. et al. // Methods Enzymol.– 2006.– Vol. 419.– P. 439–473.
5. Minguell J.J. Mesenchymal stem cells. / J.J. Minguell // Exp. Biol. Med. – 2001. – Vol. –226. – P. 507–520.
6. Mitchell K.E. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia / Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M. et al. // Stem Cells.– 2003.– Vol. 21.– P. 50–60.
7. Sarugaser R. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. / Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M.M., Davies J.E. // Stem Cells.– 2005.– Vol. 23.– P. 220–229.
8. Wang H.S. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. / Wang H.S., Hung S.C., Peng S.T. et al. // Stem Cells. 2004. – Vol. 22 – P. 1330 – 1337.
9. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. et. al. // Mol. Biol. Cell. – 2002. – Vol. 13. – P. 4279 – 4295.
10. Zuk P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. / Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et. al.// Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7. P. 211 – 228.

Рецензент – д.вет.н., професор Коцюмбас Г.І.