

**ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛІНІЙНИХ МИШЕЙ
С 57BL/6 ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ВИДІЛЕННЯ ПЕРВИННОГО МАТЕРІАЛУ**

***А.Й. Мазуркевич, доктор ветеринарних наук, професор
Л.В.Кладницька, кандидат ветеринарних наук, доцент
В.В.Ковпак, кандидат ветеринарних наук****

*Наведено результати дослідження життєздатності та проліферативної активності мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 за різних умов отримання первинного матеріалу. За показником градієнта щільності фікола 1,074 та 1,076 та параметром центрифугування 300 об/хв встановлена така кількість клітин $713802,9 \pm 3860,7^{**}$ та $635502,4 \pm 4548,2^*$, коефіцієнт проліферації $2,86 \pm 0,01^{**}$ і $2,54 \pm 0,02^*$, життєздатність – $95,37^* \pm 0,43$, $91,20 \pm 0,13$ відповідно. Підтверджена висока життєздатність – $96,92^* \pm 0,27$ за отримання середніх показників чисельності МСК при культивуванні за умов отримання первинного матеріалу 1,078 та параметра центрифугування 300 г.*

Мезенхімальні стовбурові клітини, проліферативна активність, життєздатність, коефіцієнт проліферації, миші.

Стовбурові клітини поділяються на мезенхімальні (вони здатні диференціюватись у клітини тканин мезодермального походження), гематопоетичні (попередники клітин крові), нейрональні (попередники клітин нервової системи) та ін. МСК активно використовують як трансплантат, тому що вони активізують власні резерви організму, сприяють утворенню цитокінів і факторів росту; МСК є попередниками остеобластів і сприяють формуванню ремодулюючих одиниць [1,2].

Нині клітинна терапія набула великого значення. Завдяки трансплантації стовбурових клітин лікують багато захворювань у гуманній медицині [6]. Зрозуміло, що для цих цілей бажано використовувати аутологічні МСК [3]. Навіть, якщо відсутні протипоказання, донором первинного матеріалу для отримання МСК може бути сам пацієнт, що зведе нанівець чималу кількість факторів, що можуть запустити небажані реакції імунної системи у останнього. За даними літератури відомо, що значне число пасажів, яке необхідне для отримання достатньої кількості клітинної маси для трансплантації спричиняє небажані зміни фенотипу популяції культивованих клітин [4, 5].

МСК отримують зазвичай з кісткового мозку, хоча їх можна виділяти із фетальних органів гемопоезу, із скелетних м'язів, із жирової тканини. Виділення і культивування МСК відносно нескладні, але існує проблема

отримання однорідної клітинної популяції мезенхімальних стовбурових клітин у достатній кількості для трансплантації та криоконсервації з метою подальшого використання.

За відомими методиками вирощування МСК з кісткового мозку зазвичай отримують гетерогенні популяції клітин строми з незначним вмістом у них стовбурових клітин. У роботі з МСК використовують традиційні методики роботи з клітинами, у кожному випадку добираючи індивідуальну послідовність дій, умови виділення та напрацювання клітинної маси.

Відомий спосіб отримання МСК, заснований на здатності клітин прикріплюватися до поверхні культурального посуду та використанні певних лотів бичачої ембріональної сироватки. Внаслідок цього були ізольовані клітини з більшою адгезивною здатністю, швидкістю проліферації і часом збереження мультипотентності [7].

Наступний спосіб виділення МСК людини, що ґрунтується на отриманні мононуклеарних клітин центрифугуванням у градієнті фікола, селекції на антитіла до поверхневого антигену CD105, що експресується на поверхні МСК, і культивуванні клітин, що прикріплюються до пластику. Частка відібраних CD105 + клітин становила 2–3 % від фракції моноядерних клітин. Завдяки цьому отримана популяція клітин, що володіють морфологією і профілем експресії поверхневих антигенів, характерними для МСК [8].

Для формування та росту колоній МСК кісткового мозку необхідна певна концентрація аутокринних ростових факторів у культуральному середовищі. За різних методик отримання первинного матеріалу для культивування МСК, співвідношення та кількість наведених речовин неоднакова, що, у свою чергу, впливає на формування та ріст їх колоній.

Враховуючи вищевикладене актуальним є питання умов виділення первинного матеріалу для отримання МСК. За визначення умов виділення первинного матеріалу мінімізувати вплив на клітини хімічних речовин, тобто не наражати клітини негативному впливу реактивів за збільшення кількості пасажів. По-друге, отримати достатню кількість клітинної маси для трансплантації з лікувальною метою. По-третє, отримати гетерогенну популяцію клітин з високою життєздатністю.

Мета дослідження – визначення умов виділення первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 з метою отримання МСК.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин НУБіП України. Первинний матеріал отримували за чотирьох параметрів центрифугування суспензії клітин кісткового мозку мишей лінії C 57BL/6 у градієнтах щільності фіколу (перший – 1,074, другий – 1,076, третій – 1,078, четвертий – 1,080) з величиною відцентрової сили 300 g та культивували *in vitro* в CO₂-інкубаторі за температури 37 °C та концентрації CO₂ – 5 % за абсолютної вологості на культуральному середовищі Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), з додаванням 20 % FBS (фетальна сироватка телят); 10 мкл/см³

– антибіотика-антимікотика. Заміну середовища проводили кожні 3-и доби для елімінації клітин, що не прикріпилися. Візуальну оцінку проліферативної активності клітин здійснювали кожні 24 години. Остаточний підрахунок кількості клітин, їх життєздатність, визначення коефіцієнта проліферації проводили на момент утворення моношару в одному із зразків. Контролем слугували стандартні умови отримання первинного матеріалу і культивування отриманих клітин (центрифугування кісткового мозку у середовищі DMEM без використання фікола, культивування – за аналогічних умов із дослідом). Життєздатність визначали використовуючи 0,5 %-й вітальний барвник трипанового синього. Підрахунок клітин проводили у камері Горяєва. Візуальну оцінку формування моношару MCK здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss). Одержані результати опрацьовано статистично [10].

Результати дослідження. Як свідчать результати досліджень, умови отримання первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей C 57BL/6 суттєво впливають на проліферативну активність MCK під час культивування. При культивуванні у середовищі DMEM первинного матеріалу, отриманого за показником градієнта щільності фікола 1,074 та 1,076 та параметра центрифугування 300 об/хв вже за 24 години культивування була помітна суттєва різниця у прикріпленні MCK до дна культурального посуду. Саме у цих зразках ми реєстрували швидше прикріплення більшої кількості клітин до дна культурального посуду. На нашу думку, це пов'язано із тим, що за вказаних показників градієнта щільності фікола у первинний матеріал потрапила необхідна кількість і саме у такому складі речовин, що забезпечує процес адгезії MCK.

Раніше утворився моношар у зразку, де використовувався первинний матеріал, отриманий за показника градієнта щільності фікола 1,074. Це засвідчує й найвищий показник кількості клітин у зразку досліді 1 порівнянно з показниками інших дослідів та контролю, що становив $713802,9 \pm 3860,7^{**}$ (табл.1).

Показник кількості клітин зразка другого досліді також був вірогідно вищим за контроль і становив $635502,4 \pm 4548,2^*$. Різниця між показниками у зразках першої, другої дослідних і контрольної груп була вірогідною і становила 22,7 і 9,0 % на користь дослідних відповідно.

За третього і четвертого параметрів центрифугування суспензії клітин кісткового мозку отриманий первинний матеріал не містив тих необхідних пропорцій мононуклеарних клітин, що забезпечують високу проліферативну активність MCK, за що свідчить нижчий від контролю коефіцієнт проліферації

1. Кількість, проліферативна активність та життєздатність MCK лінійних мишей C 57BL/6 за різних умов отримання первинного матеріалу та культивування у середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM) (n = 3, M \pm m)

	Показник	
--	----------	--

Дослід	градієнта щільності фіколу	Кількість клітин	Коефіцієнт проліферації	Життєздатність, %
Контроль	Контроль	583993,1±15676,6	2,33 ±0,06	92,35 ± 0,99
1	1,074	713802,9±3860,7**	2,86±0,01**	95,37* ± 0,43
2	1,076	635502,4±4548,2*	2,54±0,02*	91,20 ± 0,13
3	1,078	555576,4±3343,6	2,22±0,01	96,92* ± 0,27
4	1,080	355502,4±3288,4***	1,42±0,01***	82,93** ± 0,54

* - P< 0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001 порівняно з показниками контрольної групи

При визначенні коефіцієнта кореляції між показниками градієнта густини фікола і кількості клітин, що вирости у моношарі ми отримали $r = -0,97$, що свідчить про обернено пропорційну залежність між цими показниками.

Найвищі показники життєздатності МСК зафіксовано у зразках досліду 1 і досліду 3 (див.табл. 1). Треба зазначити, що максимальні показники життєздатності МСК зафіксовано не тільки у клітин, кількість яких була найбільшою, а також і у досліді 3, де був середній показник кількості клітин.

Висновок

1. Життєздатність та проліферативна активність мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 залежить від умов отримання первинного матеріалу.

2. За показника градієнта щільності фікола 1,074 та 1,076 та параметра центрифугування 300 g при отриманні первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 у зразках встановлена така кількість клітин $713802,9 \pm 3860,7^{**}$ та $635502,4 \pm 4548,2^*$, коефіцієнт проліферації $2,86 \pm 0,01^{**}$ і $2,54 \pm 0,02^*$, життєздатність – $95,37^* \pm 0,43$, $91,20 \pm 0,13$ відповідно.

3. Підтверджена висока життєздатність МСК $96,92^* \pm 0,27$ за середніх показників чисельності при культивуванні за умов отримання первинного матеріалу з кісткового мозку лінійних мишей С 57BL/6 за показника градієнта щільності фікола 1,078 та параметра центрифугування 300 g.

Список літератури

1. Jiang Y, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R.Ortiz-Gonzalez, et al – Nature, 2002; - 418:41–49. doi: 10.1038 /nature00870.

2. Quirici N. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. / N. Quirici, D. Soligo, P.Bossolasco, F. Servida, C.Lumini, G.L. Deliliers – Exp Hematol. -2002;30:783–791. doi: 10.1016/S0301-472X(02)00812-3.

3. Song L. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency/ L. Song, N.E. Webb, Y.Song, R.S.Tuan – Stem Cells. – 2006; 24:1707–1718. doi: 10.1634/stemcells. 2005-0604.

4. Jiang Y. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. / Y. Jiang, B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M.Reyes. – Exp Hematol.2002; 30:896–904. doi: 10.1016/S0301-472X(02)00869-X

5. Izadpanah R, Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue/ R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel// J. Cell Biochem.2006; 99:1285–1597. doi: 10.1002/jcb.20904.

6. Baksh D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy/ D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan// J. Cell Mol Med. 2004;8 :301–316.

7. Heynesworth S.E. Characterization of cells with osteogenic potential from the human bone marrow / S.E. Heynesworth, J. Goshima., V.M. Goldberg, A.I. Calpan – Bone. –1995. –Vol. 13. – P.81–95 .

8. Majumdar M.K. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells / M.K. Majumdar, V. Banks., D.P. Peluso, E.A. Morris / J. Cell. Physiol. 2000. Vol. 185. P.98–106.

*Представлены результаты исследования жизнеспособности и пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга линейных мышей C 57BL / 6 при различных условиях получения первичного материала. При показателях градиента плотности фиколла 1,074 и 1,076 и параметра центрифугирования 300 г установлено следующее количество клеток $713802,9 \pm 3860,7^{**}$ и $635502,4 \pm 4548,2^*$, коэффициент пролиферации $2,86 \pm 0,01^{**}$ и $2,54 \pm 0,02^*$, жизнеспособность – $95,37 \pm 0,43$, $91,20 \pm 0,13$ соответственно. Подтверждена высокая жизнеспособность - $96,92 \pm 0,27$ при получении средних показателей количества МСК при культивировании в условиях получения первичного материала 1,078 и параметрах центрифугирования 300 г.*

Мезенхимальные стволовые клетки, пролиферативная активность, жизнеспособность, коэффициент пролиферации, мыши

*The results of the study viability and proliferative activity of mesenchymal stem cells from bone marrow of mice of line C 57BL/6 under different conditions obtaining primary material are presents in this article. For fikoll index density gradient 1,074 and 1,076 and 300 g centrifugation parameter, calculated the following number of cells $713802,9 \pm 3860,7^{**}$ and $635502,4 \pm 4548,2^*$, proliferation rate $2,86 \pm 0,01^{**}$ and $2,54 \pm 0,02^*$, vitality – $95,37 \pm 0,43$, $91,20 \pm 0,13$ severally. Confirmed high viability - $96,92 \pm 0,27$ to obtain the average number of MSCs when cultured under conditions of a primary material 1,078 and parameter centrifugation 300 g.*

Mesenchymal stem cells, proliferative activity, viability, proliferation rate, mouse