

Простой способ клонирования эмбриональных гемопозитических клеток человека

Е. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш, С. В. Подольская*, Т. А. Рубан

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Предложен простой метод клонирования эмбриональных гемопозитических клеток человека. Метод основан на использовании естественных ростовых факторов и сохранении кроветворного микроокружения нативного органа

Одним из важнейших этапов в развитии гематологии явилось создание методов клонирования кроветворных клеток. Получение клонов кроветворных клеток вне организма основано на создании полутвердой или вязкой консистенции культуральной среды, препятствующей удалению клеток друг от друга при их делении. В таких условиях клетки, обладающие необходимым пролиферативным потенциалом, образуют колонии или клоны. Для этих целей обычно используют агар, агарозу, метилцеллюлозу или плазменный сгусток. Другими необходимыми условиями для обеспечения клональной пролиферации кроветворных клеток является применение высококачественных культуральных сред, эмбриональных сывороток, создание определенной газовой среды и 100 %-й влажности атмосферы, в которой происходит культивирование. В 1970 г. была предложена простая и воспроизводимая методика клонирования кроветворной ткани человека — двухслойная агаровая система. В качестве источника специфического стимулятора (колониестимулирующего фактора) в этой системе используется фидер из лейкоцитов периферической крови человека, которые помещают в 0,5 %-ю агаровую среду. В организме человека и животных многие органы и ткани способны к синтезу колониестимулирующих факторов (КСФ): лейкоциты [1, 2] и мононуклеары [1, 3] периферической крови, суспензия костномозговых клеток, цельная костномозговая ткань, негемопозитические (стромальные) клетки костного мозга [4], селезенка [5, 6], плацента, легкие [7], мышцы, жировая ткань, стенка брюшины, стенка сосудов [2]. Не совсем понятно при этом, чем обусловлено такое свойство природной способностью различных тканей продуцировать КСФ или присутствием каких-то определенных классов клеток, имеющих во всех органах и тканях и синтезирующих КСФ. Что касается второй гипотезы, то в этом отношении представляют наибольший интерес некоторые типы кроветворных клеток (моноциты, макрофаги, лимфоциты) и негемопозитические клетки, входящие в состав индуцирующего кроветворение микроокружения кроветворных органов, но присутствующие и в других тканях (фибробласты, эндотелиальные и жировые клетки). Мы разработали вариант методики

*Correspondence address.

клонирования кроветворных клеток, основанный на сохранении индуцирующего кроветворение микроокружения, в котором используются имеющиеся в нативном органе колониестимулирующие факторы.

Нами разработан способ получения и культивирования эмбриональных гепатоцитов человека с повышенным выходом жизнеспособных клеток. В основу способа положен ферментативно-механический метод обработки исходной ткани со сведением к минимуму манипуляций, повреждающих эмбриональные гепатоциты [8]. Полученные шадящим методом гепатоциты использовались в качестве фидера в двухслойной агаровой культуре.

Приготовление фидерного слоя. Источником культуры служила печень 8—12-недельных эмбрионов человека. Материал получали при операциях прерывания беременности методом вакуум-экстракции [9]. Извлеченный эмбрион стерильно переносили в стеклянную бутылку с 10 мл среды Игла, содержащей антибиотик канамицин в концентрации 500 мкг/мл. Затем эмбрион трижды отмывали средой Игла с концентрацией антибиотика 50 мкг/мл. Вскрыв брюшную полость эмбриона, извлекали печень и трижды промывали ее средой Игла с канамицином (50 мкг/мл). Печень помещали в смесь 0,25 %-го раствора трипсина и стандартного раствора версена (в соотношении 1:1) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 25—30 мин. По окончании инкубации смесь трипсин — версен удаляли пипеткой с последующим промыванием печени средой Игла. Печеночную ткань суспендировали в небольшом количестве среды без сыворотки, подсчитывали число клеток в камере Горяева и переносили в чашки Петри диаметром 40 мм. Посевная доза составляла $1 \cdot 10^6$ клеток на чашку. Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5 %-го CO_2 в стандартной ростовой среде: среда Игла с глютамином — 40 %; гидролизат лактальбумина — 40 %; эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) — 20 %; канамицин 50 — мкг/мл.

Через 24 ч клетки пересевали, в последующем пересев осуществляли по достижении клетками монослоя. Эффективность метода оценивали по количеству живых клеток при окрашивании 0,3 %-м трипановым синим и ростовым способностям культивируемых клеток (прирост клеток, число пассажей). Исследование жизнеспособности изолированных гепатоцитов показало, что доля живых клеток при переводе их в культуру превышала 90 % (более высокий процент, чем при использовании других способов выделения).

Приготовление верхнего слоя. По достижении эмбриональными гепатоцитами монослоя их покрывали питательной средой 0,3 % агара, подогретой до 40 °С. Состав среды: среда Игла 2 х — 35 %; ЭТС — 29 %; триптозофосфатный бульон — 1 %; агар 1 %-й — 35 %.

После затвердения агара при комнатной температуре чашки с фидером помещали в термостат и хранили в условиях 100 %-й влажности, 5 %-го CO_2 и температуре 37 °С в течение 20—30 дней.

Питательную среду с 0,3 % агара смешивали с $1 \cdot 10^5$ исследуемых клеток в 1 мл среды и разливали в чашки с фидером по 1 мл на чашку. После застывания верхнего слоя при комнатной температуре чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 7—14 дней. Колонии клеток обнаруживались под микроскопом уже через неделю. Окрашивание проводили через 12 дней по модифицированному методу Лобынцевой и Вотяковой [9].

При учете выделяли три типа колоний. К первому типу относили компактные колонии, состоящие из гранулоцитарных элементов на всех стадиях развития; ко второму — колонии, имеющие центральное ядро и диффузный венчик из макрофагов; к третьему — колонии диффузные, состоящие преимущественно из макрофагов.

Сохранение естественного микроокружения кроветворного органа позволяет эффективно клонировать гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека. Заменить действие фидерных клеток введением очищенных ростовых факторов пока не удалось [10, 11].

О. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш, С. В. Подольська, Т. О. Рубан

Простий спосіб клонування ембріональних гемопоетичних клітин людини

Резюме

Запропоновано протий метод клонування ембріональних гемопоетичних клітин людини. Метод базується на використанні природних ростових факторів та збереженні кроветворного мікрооточення нативного органа

H. M. Suhorada, L. L. Lukash, S. V. Podolskaya, T. A. Ruban

The simple method for cloning of human embryonic hemopoietic cells

Summary

We have modified a method for cloning of human embryonic hemopoietic cells. This method is based on providing of natural growth and differentiation factors and preservation of native organ hemopoietic micromedia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chervenick P. A., Lobuglio A. F. Human blood monocytes: stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation *in vitro* // Science.—1972.—178.—P. 164—166.
2. Knudtson S., Mortensen B. T. Growth stimulating of human bone marrow cells in agar culture by vascular cells // Blood.—1975.—46.—P. 937—943.
3. Gealbraith P. R., Baker F. L., Cooke L. J. et al. Factors influencing *in vitro* production of colony-stimulating factor by mononuclear leukocytes from humans // Canad. Med. Assoc. J.—1979.—121.—P. 172—178.
4. Афанасьев Б. В., Алмазов В. А. Родоначальные кроветворные клетки человека. Физиология и патология.—Л.: Наука, 1985.—204 с.
5. Bradley T. R., Hodson G. S., Bertoncello I. Characteristics of primitive macrophage progenitor cells with high proliferative potential: Relationship to cells with marrow repopulating ability in 5-fluorouracil treated mouse bone marrow // Exp. hematol. today / Eds S. J. Baum et al.—Basel, 1980.—P. 285—297.
6. Paran M., Sachs L., Barak Y., Resnitzky P. *In vitro* induction of granulocyte differentiation in hemopoietic cells from leukemic and nonleukemic patients // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1970.—67.—P. 1542—1549.
7. Fojo S. S., Wu M. C., Gross M. A. et al. Purification and characterization of a colony stimulating factor from human lung // Biochemistry.—1987.—17.—P. 3109—3116.
8. Блюмкин В. М., Скалецкий Н. Н., Бабикова Р. А. и др. Получение культур из печени эмбрионов человека // Бюл. эксперим. биологии и медицины.—1988.—105, № 2.—С. 212—214.
9. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешников С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).—Киев: Наук. думка, 1988.—192 с.
10. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения.—М.—1980.—216 с.
11. Фриденштейн А. Я. Стволовые остеогенные клетки костного мозга // Онтогенез.—1991.—22, № 2.—С. 189—197.