

УДК: 57.089.2:615.012

**ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ ВИДІВ ПІДЛОЖОК В КУЛЬТИВУВАННІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН**

*Холодкова О.Л., Пихтеев Д.М., Щербатюк А.Л.  
Одеський державний медичний університет*

**Ключові слова:** біотехнологія, культивування мезенхімальних прогеніторних клітин, стовбурові клітини

**Вступ**

Останніми роками методи регенеративної медицини успішно використовуються по всьому світу. Відповідно до сучасних уявлень, фізіологічна регенерація тканин дорослого організму та їх репарація у випадку ушкодження здійснюється за безпосередньої участі малодиференційованих (плюріпотентних) клітин-попередників та стовбурових клітин. Встановлено, що залежно від мікрооточення стовбурові клітини здатні долати гемопоетичний (мезенхімальний) бар'єр, тобто мають високу пластичність у плані дедиференціювання та трансдиференціювання [1-5]. Ці та інші спостереження дали поштовх до розвитку медико-біологічних досліджень, спрямованих на вивчення можливості використання стовбурових клітин для терапії багатьох відомих набутих та спадкових захворювань. Основним джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок, здатний генерувати попередників клітинних елементів усіх тканин організму. Так, для лікування цукрового діабету успішно використовується трансплантація культур острівкових кліток підшлункової залози [6], для лікування різних форм печінкової недостатності застосовується екстракорпоральне підключення донорських гепатоцитів і спленоцитів [7], також штучно вирощують

поза організмом з подальшою заміною у хворого кровоносних судин, серцевих клапанів, шкіри, кісток, хрящів [8-13] і т.д. Відомо багато експериментальних робіт, в яких клітини різних фенотипів трансплантували в зону некрозу міокарду. Показано, що пересажені в міокард клітини утворюють контакти з кардіоміоцитами хазяїна, стимулюють ангіонеогенез і переживають після трансплантації до 6 місяців [14-23]. Незважаючи на багатий досвід сучасних фахівців в області клітинних технологій, лишаються нез'ясованими багато питань як щодо поведінки клітин в організмі після трансплантації, так і до технологій культивування.

Тому **метою нашого дослідження** стало кількісно та якісно оцінити культури мезенхімальних прогеніторних клітин, що їх культивували за різними методиками.

**Матеріали та методи дослідження**

Для постановки культури обрали 6 мишей лінії ICR, віком 6 місяців. Тваринам під легкою ефірною анестезією проводили дислокацію шийних хребців та швидко виділяли обидві стегнові кістки. Їх очищали механічно від м'яких тканин та поміщали в сольовий розчин Хенкса, що не містить іонів  $Ca^{2+}$  і  $Mg^{2+}$ , з кінцевим вмістом пеніциліну та стрептоміцину сульфа-

ту по 20 Од і  $5 \times 10^{-5}$  г, відповідно. Кістковий мозок вимивали таким самим розчином, забирали в центрифужну пробірку та суспендували за допомогою шприця з голкою 23G. Далі проводили кілька циклів центрифугування при 2500 об/хв. по 5 хвилин. Після цього, осад із клітин центрували у градієнті «Percoll» із щільностями 1,065 – 1,073, за допомогою чого відсепарували та відбирали шар, що містить лейкоцити. Лейкоцитарну фракцію промивали у середовищі DMEM, з доданням 10 % фетальної бичачої сироватки та розсаджували на 6 чашок Петрі, на ростову поверхню двох з яких попередньо було нанесено колагенову підложку, на поверхню наступних двох – агарову підложку, та на останні дві – фібринову. Колагенову підложку готували із сухожилів хвостів мишей [24]. Агарова підложка являла собою 1,5 % розчин Агар-Агар «DIFCO», приготований на середовищі DMEM/F12 у співвідношенні 1:1. Після формування колагенової та агарової підложок, в чашки вливали 15 мл живильного

середовища, а потім вносили клітини, що їх було отримано із кісткового мозку мишей. Фібринова піложка являла собою плазму крові щурів, яку готували безпосередньо перед нанесенням на ростову поверхню чашки Петрі. Після формування фібринової підложки петлею вносили клітини, що їх було отримано із кісткового мозку мишей, та, після згортання плазми, добавляли живильне середовище. Всі клітини культивували в середовищі DMEM/F12 у співвідношенні 1:1, з доданням 10% фетальної бичачої сироватки, антибіотиків, вітамінів. Інкубували при температурі 37 °C з вмістом у газовій фазі 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % вологості. Через 24 години робили першу заміну живильного середовища, в склад якого добавили фактор росту фібробластів. Підраховували кількість клітин із застосуванням барвника трипанового синього в камері Ньюбауера. Всього отримали  $6,2 \times 10^6$  клітин/мл, серед них 1,3 % клітин, що не сприймали барвник. Умови інкубування лишались не змінними. Наступні заміни середовища на аналог-

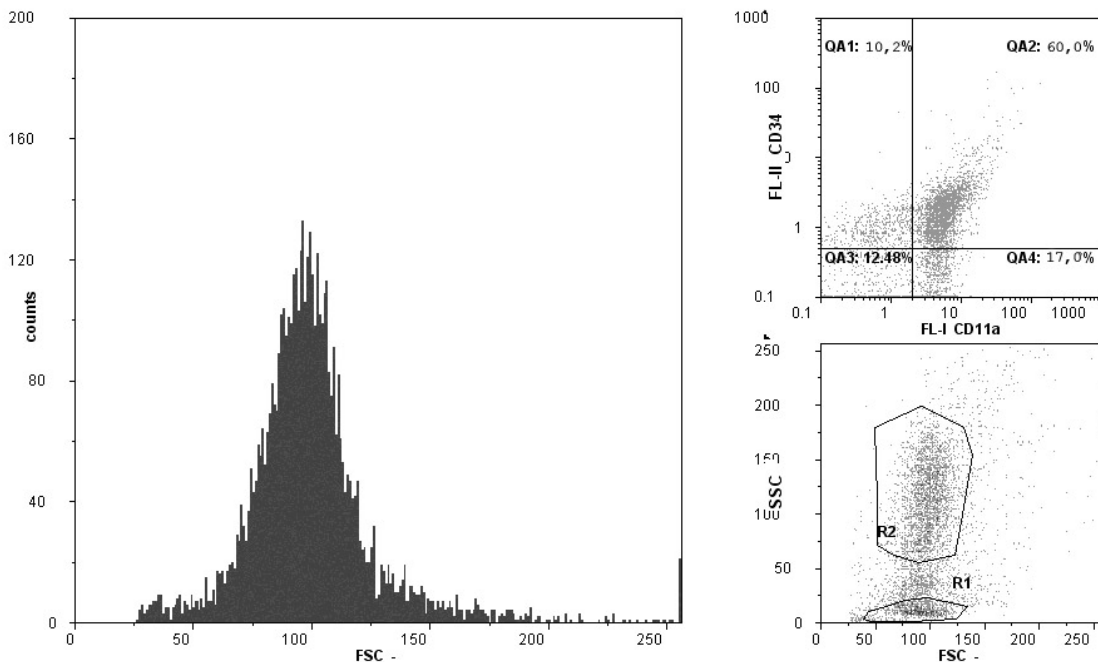


Рис. 1. Дані проточної цитофлуориметрії вихідної суспензії клітин кісткового мозку.

ічне робили кожні 3 доби. На 21-ий день моношар клітин знімали за допомогою трипсину - ЕДТА.

Протягом культивування кожні три доби культури досліджували під світловим мікроскопом «Leica DLMS». З 3 по 9 добу підраховували кількість

колонієутворюючих одиниць (КУО). З 12 по 21 добу для оцінки якості культури умовно позначали ступінь якості культури (СЯК), де відмінна ступінь якості – в культурі практично відсутній клітинний детрит та неприкріплені клітини, прикріплені клітини прозорі,

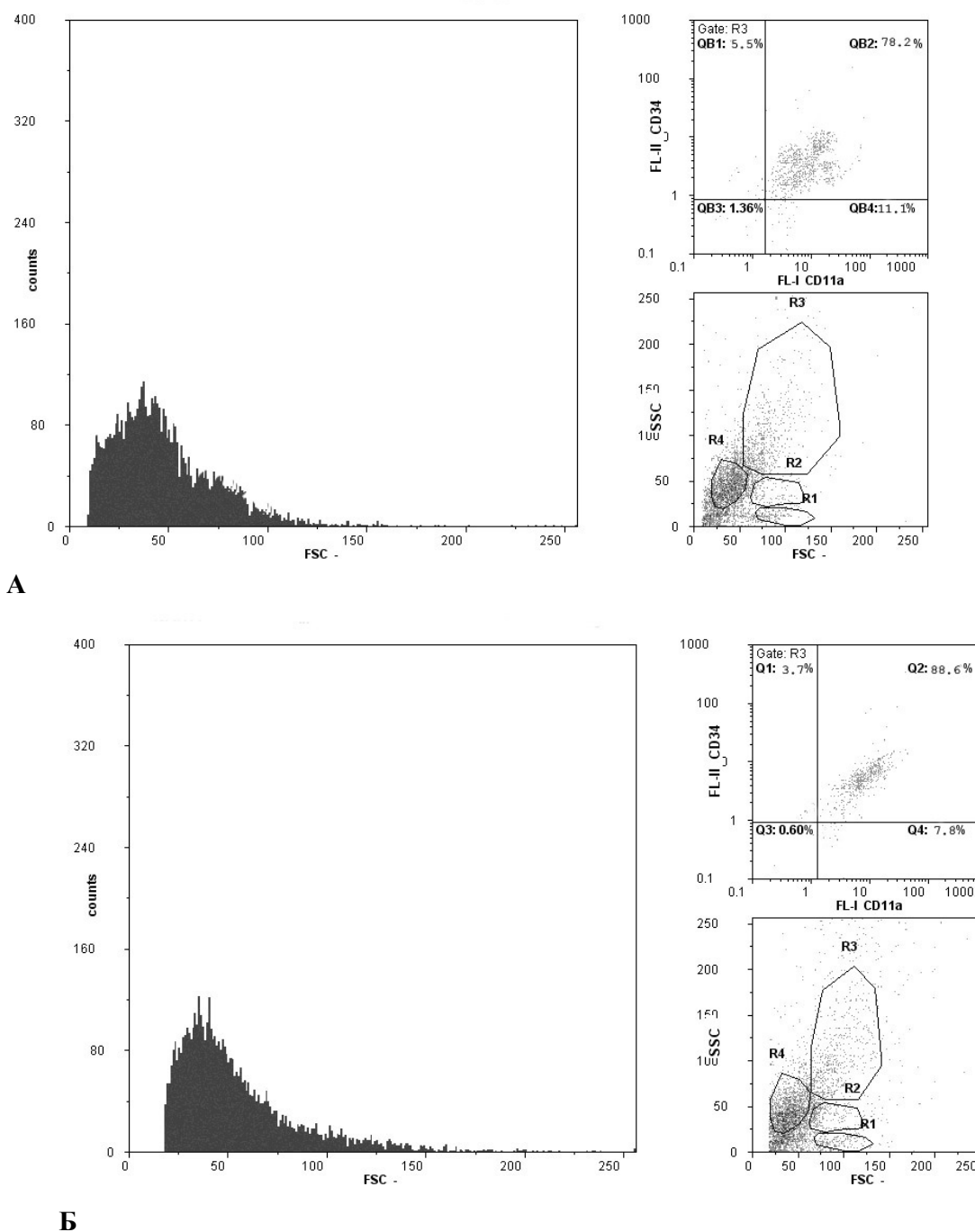


Рисунок 2. Дані проточної цитофлуориметрії суспензії клітин ККП.  
 А) на 9-й день культивування  
 Б) на 21-й день культивування

розпластані по всій поверхні матрацу, задовільна ступінь якості - в культурі клітинний детрит та неприкріплені клітини присутні у невеликій кількості, прикріплені клітини прозорі, розпластані не по всій поверхні матрацу, незадовільна ступінь якості - в куль-

турі клітинний детрит та неприкріплені клітини присутні у великій кількості, прикріплених клітин дуже мало. Також проводили імунофенотипування клітин за допомогою проточного цитофлуориметру «DAKO» до культивування та після нього на 9-й та

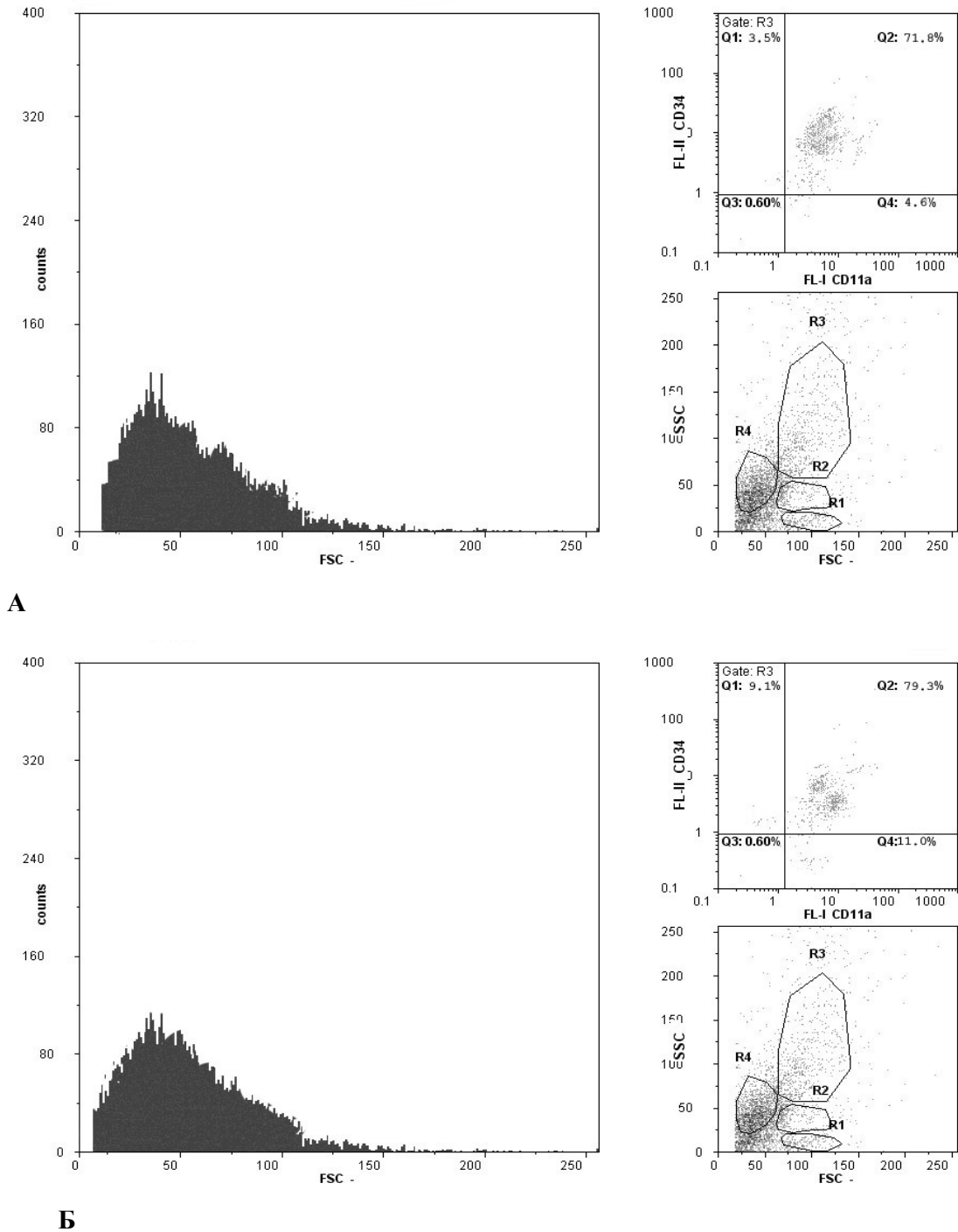


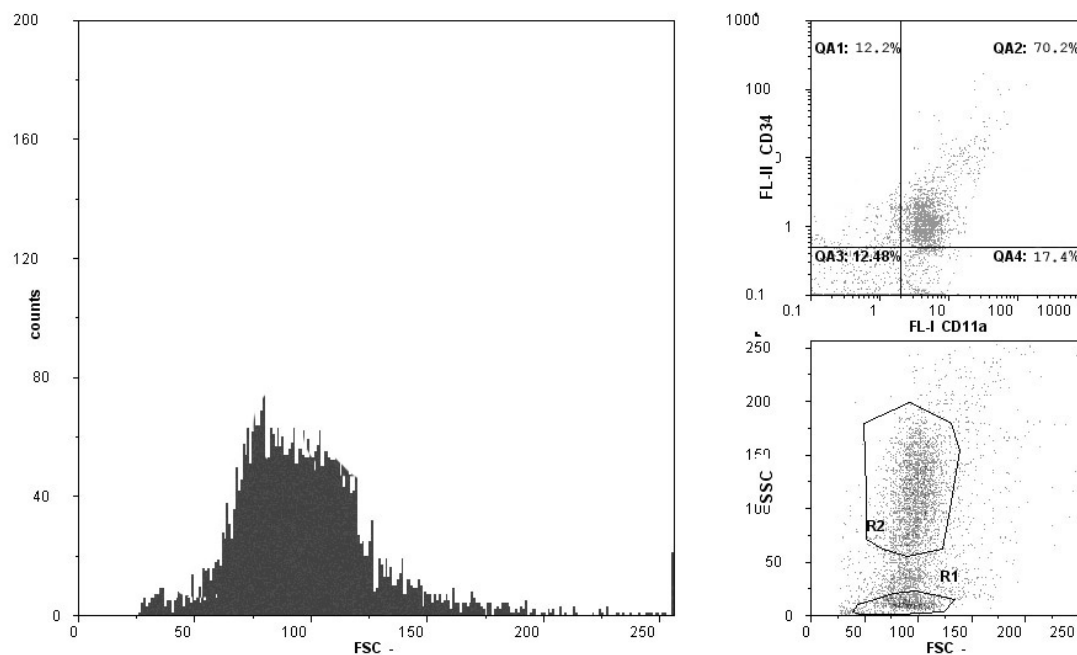
Рисунок 3. Дані проточної цитофлуориметрії суспензії клітин.  
 А) на 9-й день культивування  
 Б) на 21-й день культивування

21 день. Кількісно виявляли накопичення клітин гранулоцитарного ряду, серед яких визначали вміст клітин, що визначають ступінь диференцировки прогениторних клітин мезенхімально-го ряду – це клітини, що несуть антиген CD 11a, та ті, що експресують

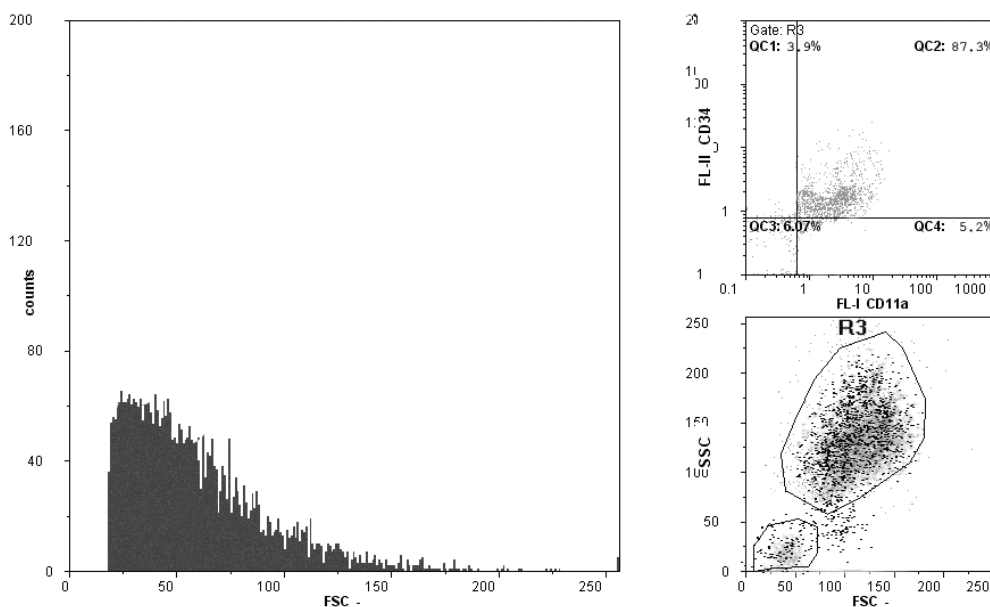
антиген CD 34. Також кількісно оцінювали наявність клітинного детриту та неприкріплених клітин.

### Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з даними проточної ци-



**А**



**Б**

Рисунок 4. Дані проточної цитофлуориметрії суспензії клітин КФП.

А) на 9-й день культивування

Б) на 21-й день культивування

тофлуориметрії, відразу після виділення клітинні суспензії характеризувались як клітинний коктейль, з вмістом гранулоцитарної фракції 51,4 %, при цьому вміст клітин, що несуть антиген CD 11a, склав 77,0 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 70,2 % (рис. 1).

При дослідженні культури, що її культивували на колагеновій підложці (ККП) виявили, що на 3-ю, 6-у та 9-у добу від первинної постановки культури кількість КУО дорівнювала 10,3, 15,4 та 28,6 відповідно. Результати цитофлуориметричного аналізу культури клітин на 9-й день показали, що кількість клітин гранулоцитарного ряду складала 9,6 %, серед яких вміст клітин, що несуть антиген CD 11a склав 89,3 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 83,7 %. Кількість клітинного детриту та неприкріплених клітин складала 15,6 %. На 12-й день від первинної постановки культури, СЯК була оцінена як задовільна, а в подальші строки – як відмінна. На 21-

й день кількість клітин гранулоцитарного ряду складала 5,3 %, вміст клітин, що несуть антиген CD 11a, був 96,4 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 92,3 % (рис. 2). Клітинний детрит практично не виявлявся.

При дослідженні культури, що її культивували на агаровій підложці (КАП), виявили, що на 3-ю, 6-у та 9-у добу від первинної постановки культури кількість КУО дорівнювала 6,1, 9,15 та 16,8 відповідно. Результати цитофлуориметричного аналізу на 9-й день показали, що кількість клітин гранулоцитарного ряду складала 11,3 %, серед яких вміст клітин, що несуть антиген CD 11a був 76,4 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 75,3 %. Кількість клітинного детриту та неприкріплених клітин складала 19,7 %. На 12-й - 18-й день від первинної постановки культури СЯК була оцінена як задовільна на, а на 21-й день – як відмінна. На 21-й день кількість клітин гранулоцитарного ряду складала 7,1 %, вміст клітин, що несуть анти-

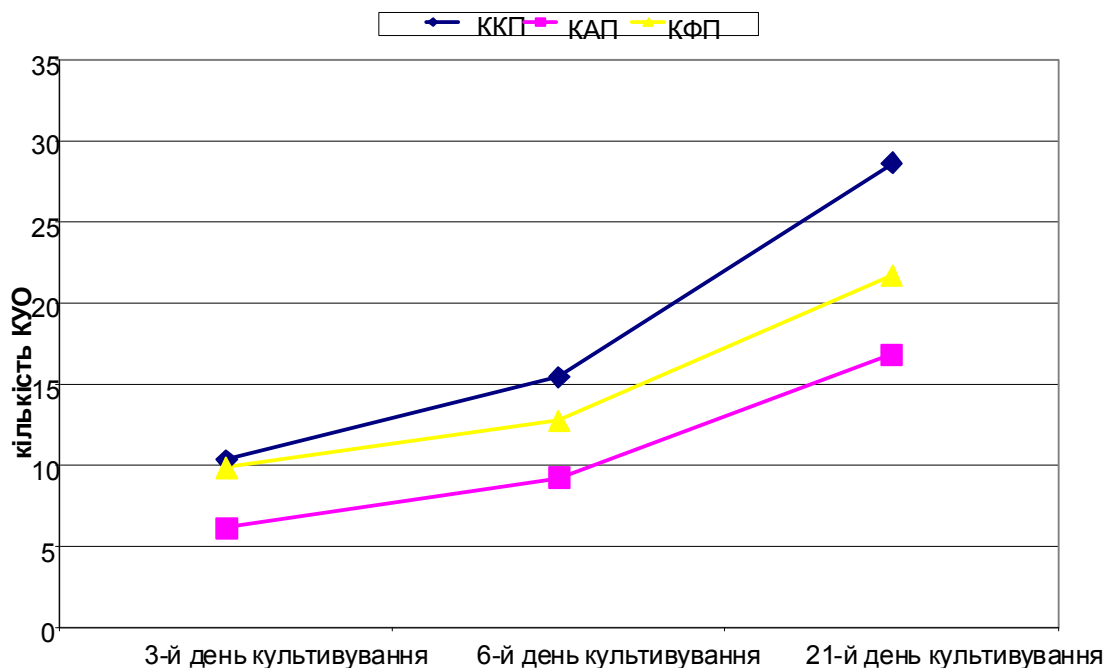


Рис. 5. Динаміка приросту КУО в піддослідних культурах.

ген CD11a, склав 90,3 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 88,4 % (рис. 3). Клітинний детрит практично не виявлявся.

При дослідженні культури, що її культивували на фібриновій підложці (КФП) виявили, що на 3-ю, 6-у та 9-у добу від первинної постановки культури кількість КУО дорівнювала 9,8, 12,7, та 21,7 відповідно. Результати цитофлуориметричного аналізу культури клітин на 9-й день показали, що кількість клітин гранулоцитарного ряду складала 8,9 %, серед яких вміст клітин, що несуть антиген CD 11a склав 87,6 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 82,4 %. Кількість клітинного детриту та неприкріплених клітин складав 15,4 %. На 12-й - 15-й день від постановки культури СЯК була оцінена як задовільна, а на 18-й – 21-й день – як відмінна. На 21-й день кількість клітин гранулоцитарного ряду становила 6,2 %, серед яких вміст клітин, що несуть антиген CD 11a, склав 92,5 %, а клітин, що експресують антиген CD 34, – 91,2 % (рис.4). Клітинний детрит практично не виявлявся.

З отриманих даних видно, що абсолютна кількість КУО ККП була декілька вищою за КФП, але ця різниця була недостовірною. Кількість КУО ККП як на 9-й так і на 21-й день була достовірно вищою за КАП на 40 % (рис. 5). Між тим, очевидно, що вид підложки не впливає на швидкість поділення клітин, тому що як в ККП так і в КАП кількість КУО до 6-ї доби зросла в 1,5 рази, а до 9-ї доби - в 2,8 разів, порівняно з 3-ю добою. Тож, розвиток культури залежить від початкової кількості прикріплених клітин. Таким чином, ККП володіє найбільш сприятливими властивостями для прикріплення клітин, порівняно з іншими піддослідними культурами. В ККП вже на 15-у добу від поста-

новки культури був відсутній клітинний детрит і культура відповідала всім ознакам відмінної якості. Тоді як в КФП ми спостерігали клітинний детрит до 18 доби, а в КАП – до 21 доби.

Аналізуючи результати цитофлуориметричного дослідження видно, що в культурах, що їх вирощували на всіх досліджуваних підложках з часом відбувається зниження вмісту гранулоцитів. Так, на 9-й день відбувається падіння їх кількості в 5-6 разів порівняно з первинною культурою. Проте, кількість клітин, що несуть антигени CD 11a та CD 34 - зростає. Але, між піддослідними культурами виявляється різниця в значеннях кількості цих клітин. Так, в ККП гранулоцитів менше ніж в інших культурах, тоді як CD 11a та CD 34 – позитивних клітин більше. В КАП навпроти, відсоток гранулоцитів більше за інші, а CD 11a та CD 34 – позитивних клітин менше. Це говорить про те, що у всіх культурах відбувається процес диференціювання прогеніторних клітин мезенхімального ряду з різною інтенсивністю. Так, ККП виявилася найбільш продуктивною культурою, а КАП найменш придатною для отримання культури мезенхімальних прогеніторних клітин. КФП за всіма досліджуваними показниками займає проміжне положення між ККП та КАП.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень**

Таким чином, виходячи з вищенаведеного можна зробити наступні висновки:

1. Культура, що її культивували за різними методиками, відповідає вимогам якісної культури, яка може бути випробувана на тваринах з метою корекції різних патологічних станів.
2. За морфологічними дослідженнями, в ККП кількість КУО була ви-

щою за інші піддослідні культури та СЯК була відмінною вже на 15-й день, тоді як в КФП на 18-й день, а в КАП - на 21-й.

3. У всіх досліджуваних культурах протягом культивування спостерігається однакова динаміка – зниження кількості гранулоцитів та підвищення вмісту клітин що несуть антигени CD 11a та CD 34.
4. На всіх досліджуваних строках кількість гранулоцитів в ККП менше ніж в інших культурах, тоді як CD 11a та CD 34 – експресуючих клітин - більше. В КАП, навпроти, кількість гранулоцитів більше за інші, а CD 11a та CD 34 – експресуючих клітин - менше. КФП за всіма досліджуваними показниками займає проміжне положення між ККП та КАП.
5. Колагенова підложка володіє найбільш сприятливими властивостями для прикріплення клітин.

#### Література

1. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue / R. H. Lee, B. Kim, L. Choi [et al.] // *Cell Physiology and Biochemistry*. - 2004. - № 4-6, Vol. 14. - P. 311-324.
2. Kassem M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy / M. Kassem, M. Kristiansen, B. M. Abdollah // *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*. - 2004. - № 5, Vol. 95. - P. 209-214.
3. Мезенхимальные стволовые клетки / Г. Т. Сухих, В. Д. Малайцев, И. М. Богданова, И. В. Дубровина // *Бюллетень экспериментальной биологии*. - 2002. - № 2, Т. 133. - С. 124-131.
4. Кухарчук О. Л. Ствобурові клітини: експеримент, теорія, клініка. Ембріональні, мезенхімальні, нейральні і гемопоетичні ствобурові клітини / О. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман // *КРС-медичинские технологи*. - 2004. - С. 380-431.
5. Culture of human stem cells / R. Ian Freshney, N. G. Stacey, J. M. Auerbach // *Wiley-Interscience*. - 2007. - P. 93-107.
6. Шумаков В. И. Трансплантация островковых клеток в лечении сахарного диабета. В кн. Трансплантация фетальных тканей и клеток. Сб. науч. ст. Под ред. В.И. Кулакова, Г.Т. Сухих. / В. И. Шумаков, Н. Н. Скалецкий // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 1998. - Т. 126 (прил. 1). - С. 109-114.
7. Early clinical experience with a hybrid bioartificial liver support / A. A. Demetriou, J. Rozga, L. Fodesta [et al.] // *Journal of Gastroenterology*. - 1995. - Vol. 30 (suppl. 208). - P. 111-117.
8. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds / H. Sator, K. Kishi, T. Tanaka [et al.] // *Transplantant* - 2004. - № 4, Vol. 13. - P. 405-412.
9. Nather A. Scaffolds in bone tissue engineering / A. Nather // *Medical Journal of Malaysia*. - 2004. - Vol. 59, Suppl. B. - P. 37-38.
10. The use of bone marrow stem cells for bone tissue engineering / M. H. Ng, B. S. Aminuddin, K. K. Tan [et al.] // *Medical Journal of Malaysia*. - 2004. - Vol. 59, Suppl. B. - P. 41-42.
11. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells



- into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. / L. X. Zhao, J. Zhang, F. Cao // *Experimental Neurology*. - 2004. - № 2, Vol. 190. - P. 396-406.
12. Cartilage-derived morphogenic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes / X. Bai, Z. Xiao, Y. Pan [et al.] // *Biochemistry and Biophysics Research Communication*. - 2004. - № 2, Vol. 325. - P. 453-460.
  13. Stem cell regeneration of the nucleus pulposus / M. V. Risbud, I. M. Shapiro, A. R. Vaccaro, T. J. Albert // *Spine Journal*. - 2004. - № 6, Vol. 4. - P. 348-353.
  14. Smooth Muscle Cell Transplantation into Myocardial Scar Tissue Improves Heart Function / R. K. Li, Z. Q. Jia, R. D. Weisel [et al.] // *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. - 1999. - Vol. 31. - P. 513-522.
  15. Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells / G. Salvatori, L. Lattanzi, M. Coletta [et al.] // *Journal of Cell Science*. - 1995. - Vol. 108. - P. 2733-2739.
  16. Chiu R. C. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. R. C. Chiu, A. Zibaitis, R. L. Kao // *Annales of Thoracic Surgery*. - 1995. - Vol. 60. - P. 12-18.
  17. Electromechanical Coupling between Skeletal and Cardiac Muscle: Implications for Infarct Repair / H. Reinecke, G. H. MacDonald, S. D. Hauschka [et al.] // *Journal of Cell Biology*. - 2000. - Vol. 149. - P. 731-740
  18. Autologous Smooth Muscle Cell Transplantation Improved Heart Function in Dilated Cardiomyopathy / K. J. Yoo, R. K. Li, R. D. Weisel [et al.] // *Annales of Thoracic Surgery*. - 2000. - Vol. 70. - P. 859-865.
  19. Yoon P. D. Myocardial regeneration: transplanting satellite cells into damaged myocardium / P. D. Yoon, R. L. Kao, G. J. Magovern // *Journal of Texas Heart Institute*. - 1995. - Vol. 22. - P. 119-125.
  20. Chiu R. C. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation / R. C. Chiu, A. Zibaitis, R. L. Kao // *Annales of Thoracic Surgery*. - 1995. - Vol. 60. - P. 12-18.
  21. Autologous transplantation of bone marrow cell improves damaged heart function / S. Tomita, R. K. Li, R. D. Weisel [et al.] // *Circulation*. - 1999. - Vol. 100 (suppl II). - P. II-247-II-256.
  22. In Vivo Survival and Function of Transplanted Rat Cardiomyocytes / R. K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // *Circulation Research*. - 1996. - Vol. 78. - P. 283-288
  23. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction / B. Assmus, V. Schachinger, C. Teupe [et al.] // *Circulation*. - 2002. - Vol. 106. - P. 3009-3017.
  24. Пол Джон. Культура клеток и ткани / Джон Пол // под редакцией Л. М. Якобсон. Изд. Медгиз. - 1963. - 346 с.

**Резюме**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗНЫХ ВИДОВ  
ПОДЛОЖЕК В КУЛЬТИВИРОВАНИИ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ  
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК**

*Холодкова О.Л., Пихтеев Д.М.,  
Щербатюк а.Л.*

В статье представлены результаты исследования культур мезенхимальных прогениторных клеток, которые культивировали в течение 21 суток на коллагеновой (ККП), агаровой и фибриновой подложках при одинаковых условиях. Обнаружили, что количество колониеобразующих единиц и качество культуры в течение всего срока культивирования на ККП выше, чем на других исследуемых подложках. Методом проточной цитофлуориметрии определили, что во всех культурах в течение культивирования наблюдается снижение количества гранулоцитов и повышение содержания клеток, которые несут антигены CD 11a и CD 34. При этом, в ККП количество гранулоцитов меньше, чем в других культурах, тогда как CD 11a и CD 34 – экспрессирующих клеток больше. Поэтому, наибольшая способность прикреплять клетки и степень дифференцировки прогениторных клеток мезенхимального ряда на ККП выше, чем в культурах, которые выращивали на других подложках.

**Summary**

**DIFFERENT KINDS OF SUBSTRATE  
USAGE FOR THE MESENCHIMAL  
PROGENITOR CELLS CULTIVATION**

*Kholodkova H.L., Pykhtyeyev D.M.,  
Shcherbatyuk A.L.*

Results of investigation of the mesenchimal progenitor cells culture grown on the collagen (CCS), agar and fibrin substrates under the same condition during 21 days are represented in this article. It was revealed that number of colony formed units and degree of the culture quality in CCS was higher than in other investigated cultures during the whole term of cultivation. Decreasing of granulocyte number and increasing of CD 11a and CD 34-expressed cells in all investigated cultures were defined according to the flow cytofluorimetry data. For all that number of granulocytes in CCS was lower then in other cultures, while number of CD 11a and CD 34 - expressed cells was higher. In this way capacity to attachment and degree of mesenchimal progenitor cells differentiation in CCS is higher than in cultures grown on the others substrates.

*Впервые поступила в редакцию 18.03.2010 г.  
Рекомендована к печати на заседании  
редакционной коллегии после рецензирования*