



Метод культивации и фенотипическая характеристика гемопоэтических клеток костного мозга (мононуклеарной фракции) от доноров с геном зеленого белка

О.И. Степанова, Н.В. Касинская, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов,
А.О. Ревякин

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.

Контактная информация: к.б.н. Степанова Ольга Ивановна, olgsima50@mail.ru

Отработан метод раздельного выделения из костного мозга гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток от здоровых доноров с геном зеленого белка, отработан метод культивирования с фенотипированием их в культуре.

Ключевые слова: клетки костного мозга, гемопоэтическая фракция, ген зеленого белка.

В последние 30 лет в России, так же как и во всем мире, стали отчетливо проявляться тревожные тенденции старения населения, неуклонного роста хронических заболеваний и инвалидизации людей трудоспособного возраста. Затраты на лечение, реабилитацию и социальную поддержку такого контингента больных ложатся тяжелым бременем на государственный бюджет и поглощают значительную часть средств, ежегодно выделяемых на здравоохранение. Указанные обстоятельства настоятельно требуют совершенствования современной системы здравоохранения, которая в значительной степени может быть достигнута благодаря освоению и внедрению в клиническую практику новых, бо-

лее эффективных и доступных методов восстановительного лечения больных. Приступив к изучению возможности применения стволовых и прогениторных клеток костного мозга в восстановительной медицине, мы убедились в том, что биологические возможности клеточной терапии стволовыми клетками вообще остаются еще мало изученными. В частности, в литературе отсутствуют четкие представления о различиях в технологии культивирования гемопоэтических и мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга перед пересадкой, не отработаны воспроизводимые технологические режимы для фибробластоподобной дифференцировки стромальной фракции стволовых клеток

костного мозга, а также не изучена эффективность применения и аллогенных, и изогеннаутологичных (в сравнении) пре-дифференцированных стволовых клеток для восстановления структуры и функции соответствующих пораженных органов.

Цель исследования – разработать технологические режимы культивирования и дать фенотипическую характеристику стволовым и прогениторным клеткам костного мозга. Идентифицировать их и использовать для восстановления структуры и функции соответствующих пораженных органов в модельных опытах на животных.

Задача исследования – отработать технологию раздельного выделения из костного мозга гемопоэтических стволовых клеток и фенотипировать их в культуре.

Материалы и методы

Эксперименты на животных проводились по двум основным направлениям: по пути отработки технологии культуральных исследований (выделения клеток, приготовления клеточных культур), а также по пути исследования терапевтических возможностей полученных клеточных культур.

В качестве доноров стволовых и прогениторных клеток костного мозга мы использовали здоровых доноров: трансгенных мышей линии B10.GFP (n=30) с геном зеленого белка для маркировки введенных клеток в организм реципиента и фенотипически здоровых гетерозиготных мышей db/+ (n=30) для осуществления изогенной трансплантации. Использование изогенных клеток костного мозга (ККМ) от здоровых доноров вместо аутологичных ККМ было связано с тем, что последние у животных

с длительной хронической патологией в организме утрачивают свою биорегуляторную активность и становятся мало пригодными для клеточной терапии.

Технология проведения культуральных исследований

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30-40 мин.). Исследовали жизнеспособность клеток гемоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим, а также пролиферативную активность в культуре стромальных ККМ по скорости образования монослоя.

Получение и ведение культур гемопоэтических (мононуклеарной фракции) клеток костного мозга (ГПКМ)

Забор клеток костного мозга проводили у мышей-доноров под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца (1мл и 2мл), вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) из костномозгового канала. Полученную суспензию клетками центрифугировали вместе с Ficoll-P (удельная плотность $1,077г/см^3$) для градиентного разделения в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре $t^{\circ}=(22^{\circ}C)$. Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую полученную интерфазу клеток мононуклеарной фракции ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ NEPES; 0,58 г/л глутамина; 100мкг/л гентамицина; 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA); 5 мкг/л

инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности в течение 4-х и 5-ти суток. Через 4-5 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой, округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток ММСК КМ (рис.). Неприкрепившиеся к пластику клетки отбирали и затем использовали в опытах на животных для трансплантации как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток моноклеарную фракцию гемопоэтических клеток. Полученная культура МНК, содержащая 2,5% CD34+/CD45+ клеток (табл.) была готова для трансплантации. От одного донора получали, в среднем, 40-60 млн МНК для трансплантации

выявляли на проточном цитофлуориметре FC-500 (USA) с использованием комбинации крысиных моноклональных антител (МАТ) к дифференцировочным и активационным маркерам (CD34-Nab8158; CD45-Nab3088; фирма Abcam, США), меченных FITC и фикоэритрином (PE). Полученный клеточный состав ГПККМ указан в таблице.

Получение первичной смешанной культуры ККМ (без фракционирования)

Суспензию ККМ получали от животных по описанной выше методике и ресуспендировали в лизирующем растворе эритроциты (114 mM NH₄Cl; 7,5 mM KHCO₃; 100 мкМ EDTA). Полученную взвесь клеток ресуспендировали в растворе Хенкса (без Ca⁺² и Mg⁺²) и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре t°=(22°C), затем удаляли надосадочную жидкость путем отсасывания и повторно центрифугировали. Полученный смешанный клеточный

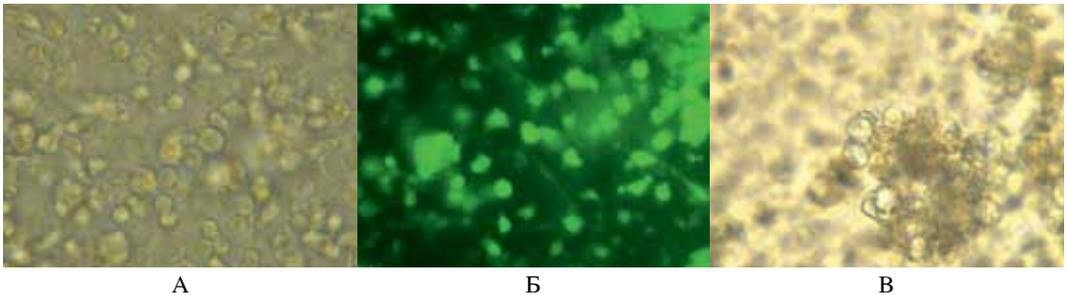


Рис. Культура гемопоэтических (моноклеарных) клеток костного мозга мышей различных линий. А, Б - 5-ти суточная культура неприкрепившихся гемопоэтических клеток (моноклеарная фракция) от доноров мышей В10.GFP; А. – Увел. X200 фазовый контраст; Б. – Увел. X200; люминесцентная микроскопия; В – 5 суточная культура неприкрепившихся гемопоэтических клеток (моноклеарная фракция) от доноров гетерозиготных мышей db/+, Увел. X200 фазовый контраст.

Фенотипическая характеристика гемопоэтической фракции стволовых клеток костного мозга

Отдельные популяции гемопоэтических стволовых и прогениторных ККМ

материал мы помещали в питательную среду (указанную выше) и культивировали в течение 5-7 дней.

Подготовка клеточного материала для трансплантации

Состав взвеси ГПКМ после культивирования в течение 5 суток

Соотношение клеточных популяций в концентрате стволовых клеток, %	После культивирования
1. Лимфоциты*)	80,2±9,6
2. Моноциты*)	18,7±1,3
3. Гранулоциты*)	1,1±1,4
4. CD34+/CD45+(по данным проточной цитометрии)	2,5±0,3

Примечание: *) – окраска по Романовскому-Гимза.

Подготовка гемопоэтических клеток костного мозга (ККМ). После завершения этапа культивирования (4-5 суток) культуру МНК 2-3 отмывали от среды с сывороткой раствором Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} путем центрифугирования клеток при 1500 об/мин 5 мин при комнатной температуре (22°C).

Производили подсчет полученных клеток в камере Горяева и подготовленные для трансплантации клетки ресуспендировали в 500-1000 мкл (при внутривенном введении) раствора Хэнкса при комнатной температуре (22°C).

Выводы

1. Отработанная технология раздельного выделения из костного мозга и культивирования гемопоэтических стволовых клеток является адекватной (подтверждена методами фенотипического исследования), воспроизводимой и пригодной для применения в культуральной исследовательской работе.

2. Процедура культивирования клеток костного мозга является первым этапом клеточной терапии.

Method of cultivation and the phenotype characteristic of marrow hemotopoetic cells (mononuclear fraction) from donors with a of green flourscent protein gene

O.I. Stepanova, N.V. Kasinskaya, O.V. Baranova, Kh.Kh. Semenov,
A.O. Revyakin

Tested process of separate allocation from the stem hematopoietic and progenitor cells from healthy donors with green flourscent protein gene. Tested a method of cultivation with their phenotyping in culture.

Key words: stem cells, hematopoietic fraction, green flourscent protein gene.