



Культивирование как способ выявления и реализации биологических и терапевтических эффектов стромальной фракции стволовых и прогениторных клеток костного мозга

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

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна scbmt@yandex.ru

Отработан метод выделения из костного мозга (стромальной фракции) стволовых и прогениторных клеток с культивированием их в ростовой среде для идентификации специфичности клеток в культуре мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

Ключевые слова: костный мозг, стромальная фракция, идентификация.

В эмбриогенезе каждый орган развивается из разных стволовых компартов и с участием различных клеток предшественников, которые, мигрируя в него по строгим законам развития, обеспечивают информационный обмен и создание соответствующих клеточных линий. Во взрослом организме клеточный состав каждого органа жестко фиксирован. Именно поэтому при гибели паренхимы органов процессы восстановительной регенерации в них могут быть эффективно воспроизведены путем рекапитуляции эмбриогенеза, за счет активной и возросшей миграции региональных стволовых клеток в зоны тканевого повреждения.

Известно, что миграционной и, следовательно, регенерационной способностью, во взрослом организме, обладают клетки иммунной системы и, прежде всего, костный мозг (КМ), который является самым мощным в организме донором стволовых и прогениторных клеток.

КМ сам по себе относится к органам, имеющим мезенхимальное происхождение, а т.к. практически все органы и ткани содержат в своей структуре клетки мезенхимы, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из костного мозга (гемопозитические и стромальные) должны быть наиболее активными участниками восстановительных процессов в органах при их повреждении.

Регенерационные эффекты МСК костного мозга гемопоэтической (преимущественно лимфоидной) и стромальной фракций клеток реализуются не только за счет стимуляции ими неоангиогенеза и предифференцировки МСК стромального ряда в специализированные клетки, но и за счет продукции ими широкого спектра цитокинов и ростовых факторов в процессе жизнедеятельности. Процесс культивирования клеток костного мозга является способом не только их клонирования но варьируя режимами и условиями культивирования клеток можно так же изменять их пластические свойства и влиять на некоторые механизмы межклеточного взаимодействия.

Цель: Отработать технологические режимы культивирования и предифференцировки стволовых клеток костного мозга в другие типы клеток (фибробластоподобные) и идентифицировать их и использовать для восстановления структуры и функции пораженных органов на моделях с хроническими патологиями.

Перед нами были поставлены следующие **задачи работы:**

Отработать технологию раздельного выделения из костного мозга мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток и идентифицировать в культуре мезенхимальные стволовые клетки.

Отработать технологий получения и идентификации клеточных культур.

Получить первичную культуру МСК и предифференцировать МСК в фибробластоподобные (ФМСК),

Материалы и методы

Донорами стволовых и прогениторных клеток костного мозга были использованы здоровые доноры – мыши 2-х линий:

- мыши линии B10.GFP (n=30) для получения как терапевтического эффекта и для маркировки введенных клеток в организм реципиента при аллогенной трансплантации;

- гетерозиготные мыши db/+ (n=30), для получения терапевтического эффекта при изогенной трансплантации.

Технология проведения культуральных исследований.

Работа по выделению клеток и их культивированию проводилась в соответствии с общими принципами осуществления культуральных исследований.

Получение культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ).

У животных под эфирным наркозом, получали стерильно клеточный аспират из костномозгового канала трубчатых костей путем вымывания из полости раствором Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}). Суспензию клеток центрифугировали 5 мин. при 1500 об/мин; осадок клеток ресуспендировали в лизирующем растворе (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:1 при комнатной температуре $t^0=(22^\circ\text{C})$ в течение 1 мин. и центрифугировали 3 мин. при 1500 об/мин, добываясь полного лизиса эритроцитов. Гемолизированный супернатант полностью удаляли отсасыванием, а клеточный осадок, содержащий МНК и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ) ресуспендировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко), с добавлением 25мМ HEPES, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Через 3-5 суток неприкрепившиеся клетки отбирали, а оставшимися пластикадгезивным клеткам в ростовую среду добавляли основной фактор

роста фибробластов (bFGF) (Sigma, USA) 20 нг/мл. Культивировали ММСК КМ для наращивания клеточной массы в течение 14 суток с постоянной заменой ростовой среды через каждые 3 дня. Через 2 недели клеточный материал, представлявший собой прикрепившиеся к пластику распластаные фибробластоподобные клетки (стромальные стволовые клетки), был готов для трансплантации (рис. 1).

Методы идентификации специфичности клеток в культуре ММСК КМ (фибробластоподобных клеток)

Использовали иммуногистохимический метод выявления коллагена I типа [Лейси А., 1992].

Иммуногистохимическое определение коллагена I типа, проводили в ММСК КМ (фибробластоподобные клетки).

Для этого плашку с культурой клеток отмывали PBS, после чего клетки фиксировали 100% метанолом при 20°C в течение 20 минут.

А, Б – 7 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей B10.GFP: А. – Увел. X200, фазовый контраст; Б. – Увел. X200; люминесцентная микроскопия; В, Г – 14 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров мышей B10.GFP для аллотрансплантации: В. – Увел. X100, фазовый контраст; Г. – Увел. X600; люминесцентная микроскопия; Д – 14 суточная культура ММСК КМ (фибробластоподобные клетки) от доноров гетерозиготных мышей db/+ для изотрансплантации; Увел. X200, фазовый контраст.

Эндогенную пероксидазную активность неспецифическое окрашивание блокировали последовательной обработ-

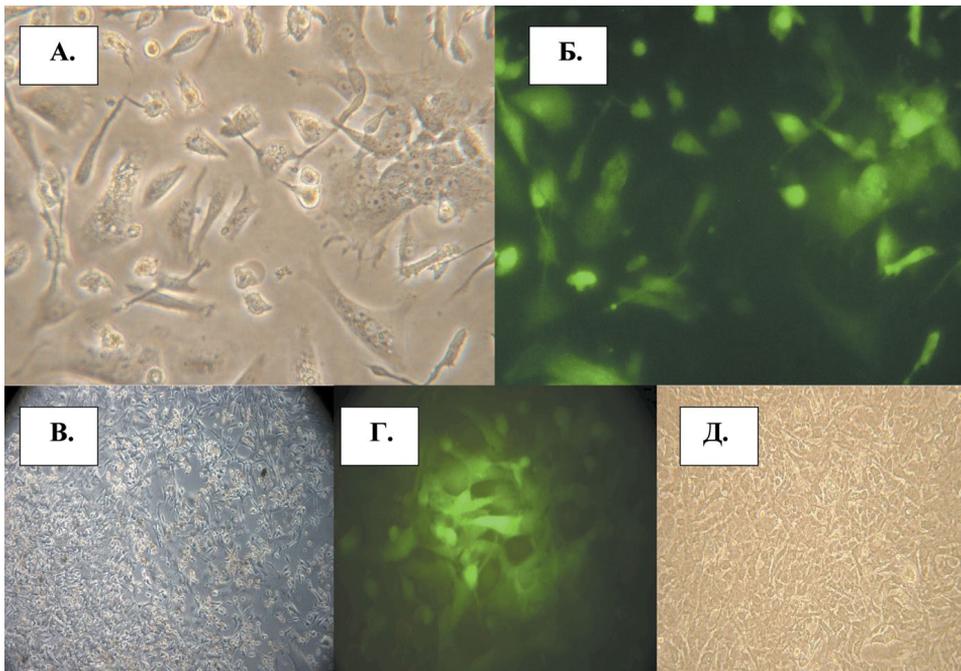


Рис. 1. Культура мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга у мышей разных линий и на разных сроках культивирования.

кой свежеприготовленными растворами: 3% перекиси водорода (10 мин), 2,28% periodic acid (5 мин), и 0,02% боргидрата натрия [borhydride] (5 мин). Затем клетки инкубировали в 3% растворе нормальной лошадиной сыворотки (в 0,005M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH=7.6) в течение 30 мин и далее инкубировали 36-48 часов при 4°C с первичной антисывороткой. Эту антисыворотку готовили рутинным способом в концентрации 1:10.000. Козью антисыворотку разбавляли до нужной концентрации 1%-м раствором нормальной лошадиной сыворотки в Tris-буфере. После инкубации с первичной антисывороткой, препараты инкубировали при комнатной температуре 30 мин с кроличьими антикозьими γ -глобулинами (1:100), затем с кролик-пероксидаза-антипероксидаза (1:50) 30 мин. Обе антисыворотки были разбавлены в 1%-м растворе нормальной козьей сыворотки в Tris-буфере. Полученные срезы тканей далее проявляли обработкой 0,05% -м раствором diaminobenzidine-4HCl в 0,1M PBS при pH=5,8 в течение 5 мин. Коричневое окрашивание клеток на коллаген I типа (рис.2) наблюдали в световом микроскопе и фотографировали с помощью цифровой фотокамеры фирмы «OLYMPUS» (Япония) на компьютере с программным обеспечением. При окрашивании на остеопонтин и кальцитонин специфического окрашивания не наблюдали, что свидетельствовало об отсутствии остеобластной дифференцировки.

Применив иммуногистохимический метод идентификации мезенхимальных клеток по соответствующему маркеру белка - коллаген I типа, мы установили, в культуре ММСК КМ (фибробластоподобных) коллаген I типа выявляется у 100% адгезированных клеток. Этот



Рис. 2. Идентификация мезенхимальных стволовых клеток мыши в культуре маркером на коллаген I типа. 7-е сутки культивирования ММСК КМ; Окраска на коллаген I типа. Увел. x 400.

факт доказывает однородность культуры адгезированных мезенхимальных стромальных клеток и пригодность метода для их выделения и последующего применения с лечебными целями.

Необходимость предифференцировки МСК перед трансплантацией диктовалась еще и тем, что стволовым клеткам КМ присущ эффект хоминга (homing) и поэтому для удержания МСК КМ в очаге повреждения (в зоне трансплантации) эти клетки должны иметь свойства клеток соответствующего органа (ткани) фенотипа. Основываясь на представлениях о необходимости направленной фенотипической индукции процессов регенерации в поврежденном органе для восстановления его функции нами была проведена работа по отработке режимов предифференцировки МСК в фибробластоподобные клетки.

Фибробластоподобные клетки из МСК образуются постоянно, как фидерные клетки – сопутствующие клетки, вне зависимости от состава среды. Однако, их процентное содержание зависит от присутствия факторов роста и субстратспецифических добавок.

Подготовка клеточного материала для трансплантации.

Подготовка ММСК КМ. Через 2 недели культивирования клеточный материал использовали для трансплантации. Культуру адгезированных на пластике ММСК КМ дважды отмывали от среды с сывороткой с помощью раствора Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} . Затем для снятия клеток с пластика в культуру вносили раствор Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} , содержащий 0,25% раствор трипсина и инкубировали 3-5 мин. при $37^{\circ}C$ в условиях медленного перемешивания. После пипетирования клетки ресуспендировали в растворе Хэнкса при $4^{\circ}C$, содержащем 10% фетальную бычью сыворотку, центрифугировали при 1500 об/мин 5 мин. и снова ресуспендировали в растворе Хэнкса; производили подсчет полученных клеток в камере Горяева. Подготовленные для трансплантации клетки ресуспендировали в 500-1000 мкл. раствора Хэнкса при $4^{\circ}C$. В контрольной серии животным вводили такой же объем физиологического раствора без ККМ.

Все выше изложенное позволяет прийти к заключению, что процедура культивирования клеток КМ важна не только для клонирования клеток и наращивания

клеточной массы, не только важна для предифференцировки мезенхимальных (стромальных) стволовых ККМ (путем подбора состава культуральных сред и условий культивирования) и подготовки их к выполнению регионарных прогениторных функций после трансплантации.

Наши исследования показали, что состав культуральной среды и необходимость его обновления в процессе культивирования играют определяющую роль в индукции направления дифференцировки МСК.

Выводы

Отработанная технология отдельного выделения из костного мозга и культивирования мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток является адекватной (подтверждена методами фенотипического и иммуногистохимического исследования), воспроизводимой и пригодной для применения в культуральной – исследовательской работе.

Предифференцировка мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга в фибробластоподобные клетки наступает в условиях постоянного присутствия инсулина, и основного фактора роста фибробластов.

Cultivation as way of identification and realization of biological and therapeutic effects stromal fractions of stem and progenitor cells of marrow

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

Worked out a method derived from bone marrow (stromal fraction) of stem and progenitor cells by culturing them in a growth medium for proxy authentication specificity of cells in culture of pluripotent mesenchymal stem cells from bone marrow.

Key words: stem cells, hematopoietic and progenitor cells, stromal fraction, identification.